

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



## **Avaliação da Exposição a Metais Pesados em Trabalhadores da Indústria Mineira**

Daniela Carvalho Serrazina

**Mestrado em Biologia Humana e Ambiente**

Dissertação orientada por:  
Professora Ana Paula Marreilha dos Santos  
Professora Maria da Luz Mathias

2017

## **I. AGRADECIMENTOS**

Antes de começar gostaria de agradecer à FCUL (instituição e professores) a oportunidade de adquirir conhecimentos e saberes numa área que a muito admiro e desta forma aumentar as probabilidades de um futuro onde me sentirei mais completa. À FFUL, que se tornou durante muito tempo uma segunda casa, devo também o meu agradecimento, por possibilitar a realização deste trabalho.

Um sincero agradecimento à Professora Ana Paula Marreilha dos Santos por estar sempre disponível para ajudar, ensinar e por toda a compreensão e paciência. Termino este trabalho com um grande sentimento de admiração em relação ao seu trabalho.

Vanda, o sentimento de gratidão e admiração é igualmente sentido em relação a ti. Obrigado por todos os conhecimentos, ensinamentos e conselhos que me transmitiste, por todo o tempo que dedicaste a este trabalho e também por todos os momentos de descontração, diversão e histórias partilhadas. Sem ti, nada disto também seria possível.

Agradeço também à Professora Maria Luísa Mateus pelos seus conselhos e ajuda sempre que foram necessários, assim como à Professora Maria da Luz Mathias, pela orientação, disponibilidade e preocupação.

Um agradecimento ao Dr. Edgar Almeida por todo o seu suporte e colaboração no que diz respeito ao fornecimento de amostras de urina e sangue da indústria mineira.

Agradeço também o fornecimento de amostras à Professora Leonor Correia e Professora Cristina Marques, professoras da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Quero também agradecer aos colegas que se tornaram amigos. Ana e Inês, foi muito bom conhecer-vos, cada uma de vocês tão diferente e com bons conselhos para me dar. Muito obrigado por todas as conversas e o apoio que me deram.

Madalena, se a tese tivesse banda sonora sabes bem qual seria a nossa, nunca mais ouvirei essa música da mesma forma! Não podia ter pedido melhor companhia de trabalho. Foste colega, terapeuta, confidente e principalmente amiga. Tenho a certeza que toda esta experiência não teria sido tão completa e corrido tão bem sem ti, mas o meu principal agradecimento é por me fazeres voltar a acreditar na amizade.

Não podia deixar de agradecer aos meus pais pela oportunidade que me deram. Tenho em grande consideração tudo o que fizeram por mim e espero ter-vos deixado orgulhosos. Agora, apenas posso prometer que tentarei fazer um bom uso de tudo o que aprendi. “Bu”, não me esqueci de ti, obrigado por me mostrares que às vezes é também necessário relaxar e ter calma, tudo se acaba por resolver.

Rafa, nem sei como te agradecer. Mais uma etapa em que estiveste a meu lado. Tu que sabes as minhas inseguranças e medos e me fazes lutar para conseguir ser mais e melhor. Tu que nunca dúvidas de mim e acreditas sempre nas minhas capacidades e que me ouves, compreendes e aconselhas. Obrigado por tudo isto e muito mais. Serás para sempre a minha metade e tens o meu eterno agradecimento.

“Um final é um princípio disfarçado

Mas isso apenas percebe o sensato” - S.K.

## II. RESUMO

A indústria mineira é uma actividade que se ocupa da exploração dos recursos minerais do solo ou subsolo, bem como do seu tratamento e transformação. Nas explorações mineiras todas as fases desde a extracção, o processamento e a beneficiação do minério exigem diferentes profissões e ofícios. São ocupações desde há muito reconhecidas como árduas e sujeitas a diferentes riscos. Na verdade, riscos físicos, químicos, biológicos, ergonómicos e psicossociais podem estar presentes neste tipo de actividades, sendo a exploração mineira uma das causas de vários problemas ambientais e de saúde humana. A contaminação química causada pela exploração mineira pode afectar a saúde das populações locais, assim como a dos trabalhadores da própria mina, estando estes sujeitos a exposição a vários perigos que podem ser pré-existentes ou gerados durante o processo de mineração.

O manganês, o chumbo e o arsénio são elementos que possuem propriedades que levaram à sua exploração pelo Homem tendo em vista os mais diversificados usos. Estes metais estão presentes no solo, água, ar e alimentos e a exposição humana ocorre na maioria dos casos através da ingestão de alimentos e água contaminados. A exposição através do ar ocorre maioritariamente em ambiente ocupacional, como por exemplo em explorações mineiras.

A exposição a níveis elevados destes elementos pode provocar vários efeitos nefastos no organismo. Assim, o excesso de manganês, pode provocar diabetes, insuficiência renal, alterações hepáticas e problemas cardiovasculares. No caso do chumbo os principais sistemas afectados são o renal, imunitário, endócrino, reprodutor, cardiovascular, gastrointestinal e hematopoiético. O arsénio origina efeitos principalmente ao nível do tracto gastrointestinal, renal, sistema cardiovascular, respiratório e hematopoético, sendo importante referir que a pele é um órgão especialmente susceptível a este metalóide. Para além de todos os efeitos atrás referidos, é fundamental mencionar e realçar que a exposição a estes três elementos tem em comum efeitos nefastos ao nível do sistema nervoso.

A neurotoxicidade observada pela exposição a estes metais tem como base diversos mecanismos destacando-se a interferência na biossíntese do heme que leva à acumulação de precursores como o ácido  $\delta$ -aminolevulínico e as porfirinas (que em níveis elevados são neurotoxinas), e efeitos ao nível do sistema colinérgico podendo resultar alterações na actividade da enzima acetilcolinesterase.

Assim, este trabalho teve como proposta estudar a exposição ocupacional de uma população mineira (43 trabalhadores) a uma mistura de metais, concretamente o manganês, o chumbo e o arsénio. Pretendeu-se também avaliar alterações bioquímicas induzidas por essa exposição ao nível da síntese do heme e da acetilcolinesterase, e por fim correlacionar as alterações destes biomarcadores com a exposição aos metais em estudo. Neste sentido procedeu-se ao doseamento de manganês, chumbo e arsénio em amostras de sangue e urina, à determinação das concentrações de ácido  $\delta$ -aminolevulínico e de porfirinas na urina e da actividade da acetilcolinesterase no sangue; estas determinações foram realizadas numa população ocupacionalmente exposta e comparadas com populações controlo.

Após observação dos resultados obtidos, verificou-se que o grupo com exposição ocupacional registou na generalidade, maiores concentrações de metais na urina e sangue, comparativamente aos outros grupos em estudo (grupos controlo), com especial ênfase para o caso do arsénio (arsénio total). No entanto, ao compararmos os níveis dos metais no sangue e urina com valores referência, estes encontravam-se próximos ou abaixo dos mesmos. Foram também encontrados valores mais elevados de porfirinas na urina neste grupo, sugerindo um efeito da exposição a metais. Um aumento no ácido  $\delta$ -aminolevulínico foi também observado. As diferenças significativas encontradas referentes a actividade da acetilcolinesterase no sangue nos grupos estudados, sugerem também o efeito da exposição a metais no sistema colinérgico, sendo, no entanto, necessários mais estudos sobre este

efeito. A correlação negativa encontrada entre os níveis de ácido  $\delta$ -aminolevulínico na urina e a actividade da acetilcolinesterase no sangue sugere uma relação fisiológica entre os mesmos e o possível efeito da exposição a concentrações mais elevadas aos metais em estudo. Por fim, concluiu-se que o conjunto de biomarcadores escolhidos para este trabalho reflectiam de forma bastante satisfatória o tipo de exposição à qual cada indivíduo estava sujeito. Verificou-se assim que era possível utilizar um menor número de biomarcadores para conseguir identificar correctamente o tipo de exposição.

Palavras-Chave: Biomarcadores de exposição ao Manganês, Chumbo e Arsénio; Acetilcolinesterase; Ácido  $\delta$ -aminolevulínico; Porfirinas; Neurotoxicidade;

### III. ABSTRACT

Mining activity is a multidisciplinary industry, which upholds different jobs and trades. Being an ancient act, it is recognized as a hard process, with workers exposed to different kind of hazards. Indeed, physical, chemical, biological, ergonomic and psychosocial hazards may be present in this type of activity. Mining has always been one of the causes of various environmental and human health problems. The chemical contamination caused by the mining industry may affect the health of the local populations, as well as the workers' health, thus being prone to the exposure of many components, that may be pre-existing or spawn during the mining process.

Manganese, lead and arsenic are chemical elements which possess properties that have been used to human exploitation for all types of purposes. These elements are present in the soil, water, air and food, and much of human exposure occurs through the ingestion of contaminated food and water. Exposure through air occurs mostly in a working environment like in mines.

The repeated and high exposure to these elements may cause several problems in human health. The excess of manganese exposure may cause diabetes, kidney failure, hepatic changes and heart and lung problems. Concerning lead, the most affected systems are the renal, immune, endocrine, reproductive, cardiovascular, gastrointestinal and hematopoietic systems. The arsenic has effects mostly in the renal, gastrointestinal, cardiovascular, respiratory and homeostatic systems; the skin is especially highly susceptible to this element. Moreover, it is known that neurotoxicity is a common effect of the exposure to these three elements.

The changes caused by these elements to heme biosynthesis result in the accumulation of intermediates of this biosynthesis which stands out the  $\delta$ -aminolevulinic acid and the porphyrins that have been associated to the development of neurotoxicity. In addition, the changes caused in the cholinergic system, more precisely in the activity of the acetylcholinesterase enzyme, have also been associated to the symptoms of neurotoxicity. The three studied elements appear to be related to the referred above changes.

Thus, this work proposed to study the occupational exposure of a mining population (43 workers) to a mixture of the three mentioned metals, manganese, lead and arsenic. It was also intended to evaluate biochemical changes induced by the exposure to these metals in heme biosynthesis and acetylcholinesterase activity, and finally correlate them with the exposure to the metals. For that, manganese, lead and arsenic concentrations were determined in urine and blood samples,  $\delta$ -aminolevulinic acid and porphyrins levels determined in urine and the activity of acetylcholinesterase determined in the blood of an exposed operative population. A control population was also studied.

After observing the results, it was noticed that the group with laboring exposure registered in most situations, higher concentration of metals in both blood and urine, comparing to the remaining studied groups, although the observed levels were under the reference values. It was also found higher values of porphyrins in this group's urine, which suggests an effect due to the exposure of metals. Changes in  $\delta$ -aminolevulinic acid levels were observed, but the presence of higher values of this biomarker in the group with less bias for such, needs future enlightenment. The statistical differences found, referring to the acetylcholinesterase activity in the blood of the studied groups and the higher levels of the activity of this enzyme, in the groups with higher probability of metal exposure, also suggest the effect of metal exposure in the cholinergic system, but more studies on this effect are still needed. The negative correlation found between the last two referred biomarkers suggests a connection between them and the possible effect of a higher exposure to the studied metals. Lastly, we may say that the set of chosen biomarkers for this work reflected in a very satisfactory way the type of exposure to which

each individual was subjected. It was still verified that it was possible to use a smaller number of biomarkers and manage to accurately identify the type of exposure of each subject.

Keywords: Manganese, Lead and Arsenic biomarkers; Acetylcholinesterase,  $\delta$ -aminolevulinic acid; Porphyrins; Neurotoxicity;

## IV. ÍNDICE

I.	Agradecimentos.....	I
II.	Resumo.....	II
III.	Abstract .....	IV
IV.	Índice.....	VI
	Lista de Quadros e Figuras .....	VIII
	Lista de abreviaturas.....	X
	1 ° Capítulo - Introdução .....	1
1.1	Toxicologia Ocupacional .....	1
1.2	A Indústria Mineira em Portugal .....	2
1.3	Toxicologia dos Metais .....	3
1.4	Manganês .....	4
1.4.1	Fontes de Exposição .....	4
1.4.2	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção .....	5
1.4.3	Toxicidade Geral .....	6
1.4.4	Neurotoxicidade e Seus Mecanismos.....	6
1.4.5	Estudos Ocupacionais .....	8
1.5	Chumbo .....	8
1.5.1	Fontes de Exposição .....	8
1.5.2	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção .....	9
1.5.3	Toxicidade Geral .....	10
1.5.4	Neurotoxicidade e Seus Mecanismos.....	11
1.5.5	Estudos Ocupacionais .....	13
1.6	Arsénio .....	13
1.6.1	Fontes de Exposição .....	14
1.6.2	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção .....	14
1.6.3	Toxicidade Geral .....	15
1.6.4	Neurotoxicidade e Seus Mecanismos.....	18
1.6.5	Estudos Ocupacionais .....	19
1.7	Interações de Misturas de Metais .....	20
1.8	Biomarcadores.....	21
1.8.1	Biomarcadores de Exposição .....	22
▪	Determinação do Manganês em Amostras Biológicas .....	22
▪	Determinação do Chumbo em Amostras Biológicas.....	22
▪	Determinação do Arsénio em Amostras Biológicas.....	23

1.8.2	Biomarcadores de Efeito.....	23
▪	Avaliação de Alterações na Síntese do Heme.....	23
▪	Avaliação de Alterações no Sistema Colinérgico .....	26
2º	Capítulo - Objectivos .....	27
3º	Capítulo - Metodologia Experimental .....	28
3.1	Reagentes .....	28
3.2	Caracterização da População/Amostras .....	28
3.3	Métodos.....	29
3.3.1	Determinação de Metais no Sangue e Urina .....	29
3.3.2	Determinação da Acetilcolinesterase no Sangue.....	30
3.3.3	Determinação do Ácido $\delta$ -aminolevulínico na Urina .....	31
3.3.4	Determinação das Porfirinas na Urina .....	31
3.3.5	Determinação de Creatinina na Urina .....	31
4º	Capítulo - Resultados .....	32
4.1	Tratamento Estatístico .....	32
4.2	Concentração de Mn, Pb e As em Amostras do Conjunto A .....	33
4.3	Níveis de Porfirinas, Ácido $\delta$ -aminolevulínico na Urina e Acetilcolinesterase no Sangue em Amostras do Conjunto A .....	35
4.4	Concentração de Mn, Pb e As em Amostras do Conjunto B .....	36
4.5	Níveis de Porfirinas e Ácido $\delta$ -aminolevulínico na urina e Acetilcolinesterase no sangue em Amostras do Conjunto B .....	38
4.6	Concentração de Creatinina na Urina .....	39
4.7	Correlação entre o Ácido $\delta$ -aminolevulínico na Urina e a Acetilcolinesterase no Sangue ....	39
4.8	Análise Discriminante .....	40
5º	Capítulo – Discussão.....	43
6º	Capítulo - Conclusões .....	49
	Referências Bibliográficas .....	50



## **LISTA DE QUADROS E FIGURAS**

Tabela 3.1 -	Parâmetros de validação estimados para os métodos de determinação de metais.	30
Tabela 4.1 -	Identificação do grupo ao qual pertence cada indivíduo: expostos ocupacionalmente (O), não expostos ocupacionalmente residindo numa zona rural (Cr) e não expostos ocupacionalmente residindo em zona industrial (Ci), através dos níveis de Mn, Pb, As, ALA e porfirinas na urina e Mn, Pb, As e AChE no sangue, utilizando a análise discriminante.	40
Tabela 4.2 -	Identificação do grupo ao qual pertence cada indivíduo: expostos ocupacionalmente (O), não expostos ocupacionalmente residindo numa zona rural (Cr) e não expostos ocupacionalmente residindo em zona industrial (Ci) através dos níveis de Mn, Pb, As e AChE no sangue, utilizando a análise discriminante.	41
Tabela 4.3 -	Identificação do grupo ao qual pertence cada indivíduo: expostos ocupacionalmente (O), não expostos ocupacionalmente residindo numa zona rural (Cr) e não expostos ocupacionalmente residindo em zona industrial (Ci) através dos níveis de Pb, As e ALA na urina, utilizando a análise discriminante.	42
Figura 1.1 -	Biomarcadores de exposição, efeito e susceptibilidade.	21
Figura 1.2 -	Biossíntese do heme	24
Figura 4.1 -	Níveis de Mn na urina corrigidos pela concentração de creatinina em indivíduos expostos ocupacionalmente (O) e não expostos ocupacionalmente, residindo numa zona industrial (Ci) e residindo numa zona rural (Cr); Conjunto A.	33
Figura 4.2 -	Níveis de Pb na urina corrigidos pela concentração de creatinina em indivíduos expostos ocupacionalmente (O) e não expostos ocupacionalmente, residindo numa zona industrial (Ci) e residindo numa zona rural (Cr); Conjunto A.	33
Figura 4.3 -	Níveis de As na urina, corrigidos pela concentração de creatinina em indivíduos expostos ocupacionalmente (O) e não expostos ocupacionalmente, residindo numa zona industrial (Ci) e residindo numa zona rural (Cr); Conjunto A.	33
Figura 4.4 -	Níveis de Mn no sangue em indivíduos expostos ocupacionalmente (O) e não expostos ocupacionalmente, residindo numa zona industrial (Ci) e residindo numa zona rural (Cr); Conjunto A.	34
Figura 4.5 -	Níveis de Pb no sangue em indivíduos expostos ocupacionalmente (O) e não expostos ocupacionalmente, residindo numa zona industrial (Ci) e residindo numa zona rural (Cr); Conjunto A.	34
Figura 4.6 -	Níveis de As no sangue em indivíduos expostos ocupacionalmente (O) e não expostos ocupacionalmente, residindo numa zona industrial (Ci) e residindo numa zona rural (Cr); Conjunto A.	34
Figura 4.7 -	Níveis de porfirinas na urina corrigidos pela concentração de creatinina, em indivíduos expostos ocupacionalmente (O) e não expostos ocupacionalmente, residindo numa zona industrial (Ci) e residindo numa zona rural (Cr); Conjunto A.	35
Figura 4.8 -	Níveis de ALA na urina, corrigidos pela concentração de creatinina, em indivíduos expostos ocupacionalmente (O) e não expostos ocupacionalmente, residindo numa zona industrial (Ci) e residindo numa zona rural (Cr); Conjunto A.	35
Figura 4.9 -	Níveis de AChE no sangue em indivíduos expostos ocupacionalmente (O) e não expostos ocupacionalmente, residindo numa zona industrial (Ci) e residindo numa zona rural (Cr); Conjunto A.	35

Figura 4.10 - Níveis de Mn na urina corrigidos pela concentração de creatinina, em indivíduos expostos ocupacionalmente (O) e não expostos ocupacionalmente, residindo numa zona industrial (Ci) e residindo numa zona rural (Cr); Conjunto B.	36
Figura 4.11 - Níveis de Pb na urina corrigidos pela concentração de creatinina, em indivíduos expostos ocupacionalmente (O) e não expostos ocupacionalmente, residindo numa zona industrial (Ci) e residindo numa zona rural (Cr); Conjunto B.	36
Figura 4.12 - Níveis de As na urina corrigidos pela concentração de creatinina, em indivíduos expostos ocupacionalmente (O) e não expostos ocupacionalmente, residindo numa zona industrial (Ci) e residindo numa zona rural (Cr); Conjunto B.	36
Figura 4.13 - Níveis de Mn no sangue em indivíduos expostos ocupacionalmente (O) e não expostos ocupacionalmente, residindo numa zona industrial (Ci) e residindo numa zona rural (Cr); Conjunto B.	37
Figura 4.14 - Níveis de Pb no sangue em indivíduos expostos ocupacionalmente (O) e não expostos ocupacionalmente, residindo numa zona industrial (Ci) e residindo numa zona rural (Cr); Conjunto B.	37
Figura 4.15 - Níveis de As no sangue em indivíduos expostos ocupacionalmente (O) e não expostos ocupacionalmente, residindo numa zona industrial (Ci) e residindo numa zona rural (Cr); Conjunto B.	37
Figura 4.16 - Níveis de porfirinas na urina corrigidos pela concentração de creatinina, em indivíduos expostos ocupacionalmente (O) e não expostos ocupacionalmente, residindo numa zona industrial (Ci) e residindo numa zona rural (Cr); Conjunto B.	38
Figura 4.17 - Níveis de ALA na urina corrigidos pela concentração de creatinina, em indivíduos expostos ocupacionalmente (O) e não expostos ocupacionalmente, residindo numa zona industrial (Ci) e residindo numa zona rural (Cr); Conjunto B.	38
Figura 4.18 - Níveis de AChE no sangue em indivíduos expostos ocupacionalmente (O) e não expostos ocupacionalmente, residindo numa zona industrial (Ci) e residindo numa zona rural (Cr); Conjunto B.	38
Figura 4.19 - Níveis de creatinina na urina em indivíduos expostos ocupacionalmente (O) e não expostos ocupacionalmente: residindo numa zona industrial (Ci) e residindo numa zona rural (Cr).	39
Figura 4.20 - Gráfico de regressão linear correlacionando as concentrações de ALA na urina com os níveis de AChE no sangue, em indivíduos expostos ocupacionalmente (O) e não expostos ocupacionalmente, residindo numa zona industrial (Ci) e residindo numa zona rural (Cr).	39
Figura 4.21 - Representação gráfica de cada indivíduo de acordo com o grupo ao qual pertencem: indivíduos expostos ocupacionalmente (O) e não expostos ocupacionalmente: residindo numa zona industrial (Ci) e residindo numa zona rural (Cr), através da integração dos níveis de Mn, Pb, As, ALA e porfirinas na urina e Mn, Pb, As e AChE no sangue.	40
Figura 4.22 - Representação gráfica de cada indivíduo de acordo com o grupo ao qual pertencem: indivíduos expostos ocupacionalmente (O) e não expostos ocupacionalmente: residindo numa zona industrial (Ci) e residindo numa zona rural (Cr), através da integração dos níveis de Mn, Pb, As e AChE no sangue.	41
Figura 4.23 - Representação gráfica de cada indivíduo de acordo com o grupo ao qual pertencem: indivíduos expostos ocupacionalmente (O) e não expostos ocupacionalmente, residindo numa zona industrial (Ci) e residindo numa zona rural (Cr), através da integração dos níveis de Pb, As e ALA na urina.	42

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
ACGIH	American Conference of Governmental Industrial Hygienists
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALA	Ácido $\delta$ -aminolevulínico
ALAD	Ácido $\delta$ -aminolevulínico desidratase
ALAS	ALA-sintetase
ALA-U	Ácido $\delta$ -aminolevulínico na urina
As	Arsénio
As-S	Arsénio no sangue
As-U	Arsénio na urina
ATP	Adenosina trifosfato
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BAR	Biologischer Arbeitsstoff-Referenzwert
BHE	Barreira hemato-encefálica
Ca	Cálcio
CaM	Calmodulina
CAT	Catalase
Cd	Cádmio
ChAT	Colina acetiltransferase
Ci	Grupo residente em zona industrial
Cr	Grupo residente em zona rural
Cu	Cobre
DA	Dopamina
DMA	Ácido dimetilarsénico
DMT-1	Transportador de metal divalente-1
DOPA	3,4-dihidroxifenilalanina
DP	Doença de Parkinson

Fe	Ferro
GABA	Ácido gama aminobutírico
GAD	Ácido glutâmico
GFAAS	Espectrofotometria de absorção atômica com câmara de grafite
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogénio
Hg	Mercúrio
HGAAS	Espectrofotometria de absorção atômica em o gerador de hidretos
HO <sub>2</sub>	Hidroperóxido
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IARC	International Agency for Research on Cancer
IBE	Índice biológico de exposição
MAK-Commission	Permanent Senate Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area
MMA	Ácido monometilarsénico
MMT	Metilciclopentadienil manganês tricarbonilo
Mn	Manganês
Mn-S	Manganês no sangue
Mn-U	Manganês na urina
NE	Norepinephrine
Ni	Níquel
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartico
O	Grupo com exposição ocupacional
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pb	Chumbo
Pb-S	Chumbo no sangue
Pb-U	Chumbo na urina
PDH	Piruvato desidrogenase
PKC	Proteína cinase C

RNS	Espécies reactivas de azoto
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
SAM	S-adenosilmetionina
SCOEL	Scientific Committee on Occupational Exposure Limit Values
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SOD	Superóxido dismutase
Tf	Transferrina
TfR	Receptores transferrina
VLB	Valor limite biológico
W	Tungsténio
Zn	Zinco

# **1 ° CAPÍTULO - INTRODUÇÃO**

## **1.1 Toxicologia Ocupacional**

A segurança nos locais de trabalho tem sido uma das grandes preocupações sociais, tendo-se para isso desenvolvido metodologias que permitam a manutenção do estado de saúde dos trabalhadores e segurança a nível ocupacional (Casarett e Doull's, 2013; Miguel, 2012).

Os riscos profissionais estão sempre associados ao ambiente de trabalho onde o trabalhador exerce a sua actividade. Estes riscos estão relacionados com as condições inseguras de trabalho, que podem afectar a saúde, a segurança e o bem-estar do trabalhador. Quando estes riscos são relativos ao processo operacional, são designados por riscos de operação, já quando são relativos ao ambiente de trabalho, como por exemplo a presença de gases e vapores tóxicos, ruído, calor, entre outros, estes são designados por riscos de ambiente (Miguel, 2012).

Os agentes existentes no ambiente, passivos de afectar a saúde dos trabalhadores, são de quatro tipos: químicos, físicos, biológicos e ergonómicos. A melhor forma de prevenir e controlar os riscos do ambiente de trabalho envolve a cooperação entre as várias ciências, como a engenharia, a epidemiologia, toxicologia e química, entre outras (Casarett e Doull's, 2013; Miguel, 2012).

A toxicologia, é uma ciência multidisciplinar, tal como a medicina, que tem como objectivo o estudo dos efeitos adversos dos xenobióticos nos organismos vivos através do estudo das interacções entre as diferentes substâncias químicas e os sistemas biológicos. A toxicologia é conhecida como o estudo dos venenos, sendo por isso uma ciência que evoluiu a partir do estudo dos mesmos. Actualmente a toxicologia vai muito para além dos estudos dos efeitos adversos de agentes exógenos sendo estes agentes utilizados como ferramentas de estudo e desenvolvimento de diversas ciências, como a biologia molecular, as neurociências e a farmacologia. Na década de 70 houve um grande desenvolvimento no campo da toxicologia, sendo esta aplicada na avaliação da segurança e de risco de populações expostas a químicos (Casarett e Doull's, 2013; Timbrell, 2002).

Sendo uma das áreas de aplicação da toxicologia, a toxicologia ocupacional utiliza os princípios e metodologias da toxicologia para compreender e gerir perigos químicos e biológicos que se encontrem nos locais de trabalho. O seu objectivo é a prevenção de efeitos indesejáveis na saúde resultantes de exposições aos quais os trabalhadores estão sujeitos. É muitas vezes difícil estabelecer uma ligação entre a doença de um trabalhador e o seu trabalho. Uma das razões prende-se com a semelhança entre a expressão clínica entre as doenças ocupacionais e as não ocupacionais. O intervalo de tempo entre a exposição do trabalhador e a expressão da doença é outro factor que dificulta o diagnóstico. Por fim, as doenças de origem ocupacional podem ter origem multifactorial, relacionando-se não só com o ambiente de trabalho, mas também com outros ambientes que o trabalhador frequenta, assim como as características pessoais. Assim, é fundamental que este ramo da toxicologia possua um conhecimento vasto do ambiente de trabalho, para assim ter a capacidade de reconhecer, compreender e relacionar todos os elementos envolvidos na situação analisada (Miguel, 2012).

Para atingir o principal objectivo, a toxicologia ocupacional contribuiu com informação e dados para o processo de estabelecimento de valores limite ou determina a adequação dos mesmos. Os limites de exposição ocupacional existem para agentes químicos, biológicos e físicos, e são promulgados como valores de referência ou recomendados como orientadores para promover a saúde e segurança dos trabalhadores (Casarett e Doull's, 2013).

Um conceito fundamental em toxicologia é o conceito de dose; a relação entre a dose de um composto e a resposta que ele origina é um conceito fundamental em toxicologia e foi formulado pela primeira vez por Paracelsus (Timbrell, 2002). A dose pode ser definida como a quantidade de tóxico que atinge um tecido alvo num intervalo de tempo definido. A dose é uma função do nível de exposição e da duração e frequência da mesma. As características individuais e ambientais também podem influenciar a dose (Casarett e Doull's, 2013). A toxicidade é um fenómeno relativo que depende não só das propriedades do tóxico, mas também da dose do composto administrado ou absorvido. Todos os agentes químicos originam uma resposta biológica, que é função da quantidade absorvida e do período de tempo que dura essa absorção; para a maioria dos agentes químicos existe uma dose que não excede a capacidade de o organismo metabolizar, desintoxicar e eliminar os referidos agentes, sendo por vezes definida como resposta nula (Casarett e Doull's, 2013; Miguel, 2012; Timbrell, 2002). É com base nestes conceitos que são propostos os valores referência ou valores limite em toxicologia ocupacional.

Os valores limite de exposição dizem respeito às concentrações no ar das várias substâncias e representam condições para as quais se admite que quase todos os trabalhadores podem estar expostos, sem efeitos adversos para a sua saúde. Existem também os índices biológicos de exposição (IBE) que representam as concentrações-limite de substâncias (ou seus metabolitos) a que o trabalhador pode estar exposto, sem perigo para a sua saúde, determinadas nos tecidos e fluidos biológicos (Miguel, 2012).

Outro importante conceito em toxicologia é a variabilidade individual; nem todos os indivíduos reagem de igual modo às mesmas doses dos mesmos agentes químicos num determinado ambiente. Mesmo dentro da espécie humana, grandes variações na resposta a um determinado químico podem ocorrer devido a subtis diferenças genéticas. Diferenças hereditárias que ocorrem em mais de 1% da população são referidas como polimorfismos e podem ser responsáveis por reacções idiossincráticas a diferentes tipos de químicos. É provável que a maioria dos desenvolvimentos de doenças crónicas resulte da interacção complexa entre múltiplos genes e uma miríade de factores ambientais, incluindo a dieta, estilo de vida e exposição ambiental/ ocupacional a substancias toxicas (Casarett e Doull's, 2013; Miguel, 2012).

## 1.2 A Indústria Mineira em Portugal

No âmbito do trabalho elaborado é importante mencionar, ainda que de forma abreviada, algumas características da indústria extractiva no nosso país, mais especificamente a exploração mineira. A actividade extractiva pode assumir a forma de pedreiras a céu aberto para produção de rochas ornamentais ou industriais, oficinas de transformação de rochas ornamentais e minas subterrâneas ou a céu aberto (Matos e Pinto Ramos, 2010). A actividade mineira é uma indústria multidisciplinar, com base em diferentes profissões e ofícios. Sendo uma ocupação antiga, há muito foi reconhecida como árdua e sujeita a diferentes riscos (Donoghue, 2004). Riscos físicos, químicos, biológicos, ergonómicos e psicossociais podem estar presentes neste tipo de actividade. As doenças profissionais mais frequentemente identificadas são a surdez profissional, doenças do foro respiratório e lesões músculo-esqueléticas (Donoghue, 2004; Matos e Pinto Ramos, 2010; McPhee, 2004).

A exploração mineira em Portugal foi inicialmente realizada pelos Fenícios, mas foi intensa e maioritariamente desenvolvida pelos Romanos (DGEG, 2012). A indústria extractiva apresenta-se actualmente no nosso país com uma ampla representatividade, encontrando-se dispersa ao longo de todo o país. Portugal apresenta-se com um potencial mineiro considerável que, para além das importantes jazidas de Neves - Corvo [Cobre (Cu) e Zinco (Zn)], Panasqueira [(Tungsténio (W)) e

Aljustrel (Cu e Zn) e múltiplas ocorrências de feldspato, quartzo, caulino, sal, rochas ornamentais, agregados e águas minerais e de nascente, dispõe de outros recursos minerais relevantes especialmente no seu espaço marítimo, um dos maiores do mundo (DGEG, 2012; DGEG, 2015; Matos e Pinto Ramos, 2010).

A exploração mineira foi sempre uma das causas de vários problemas ambientais e da saúde humana. Esta pode ter impactos tais como a contaminação do solo e água e desflorestação, entre outros. Assim, para além dos danos ambientais, a contaminação química causada pela exploração pode também afectar a saúde das populações locais, assim como dos trabalhadores da própria mina. Os perigos químicos podem incluir vários componentes, como por exemplo a sílica cristalina, poeiras de carvão, partículas de diesel, arsénio (As), níquel (Ni), cádmio (Cd), mercúrio (Hg), chumbo (Pb) de entre outros componentes, que podem ser pré-existentes, ser adicionados ou gerados durante o processo de mineração (Donoghue, 2004; Voulvoulis et al., 2013).

### 1.3 Toxicologia dos Metais

Os metais são tipicamente definidos através das propriedades físicas do elemento no estado sólido, variando estas largamente de acordo com o elemento metálico em estudo. Geralmente as propriedades dos metais incluem alta reflectividade (lustro), alta condutividade eléctrica e térmica, ductilidade e solidez mecânica. Uma outra característica de grande importância a nível toxicológico, prende-se com a capacidade em doar um ou mais electrões podendo assim mais facilmente reagir com os sistemas biológicos. Mais de 75 % dos elementos da tabela periódica são considerados metais e vários são considerados metalóides (Casarett e Doull's, 2013; Jaishankar et al., 2014). Os metais pesados geralmente referem-se aos metais com densidades superiores a  $5 \text{ g/cm}^3$  (Jaishankar et al., 2014; Jarup, 2003). Existem metais que são chamados tóxicos por não desempenharem qualquer função no organismo, outros são considerados essenciais pois são necessários à manutenção de várias funções fisiológicas no organismo; contudo, os metais essenciais podem tornar-se nocivos quando atingem certas concentrações limite (Jaishankar et al., 2014).

Apesar de se conhecerem muitos dos efeitos adversos a nível da saúde resultantes da exposição a metais, a exposição aos mesmos continua nas mais diversas circunstâncias das nossas vidas, existindo mesmo um aumento da exposição em algumas partes do mundo, especialmente nos países menos desenvolvidos. Porém, o uso de metais foi e continua a ser fundamental no progresso e sucesso da civilização humana, sabendo-se que estes são usados em diferentes áreas desde há milhares de anos (Casarett e Doull's, 2013; Jaishankar et al., 2014; Jarup, 2003).

Apesar dos metais pesados ocorrerem de forma natural, a maioria da contaminação ambiental e exposição humana ocorre devido a factores antropogénicos (Jaishankar et al., 2014; Tchounwou et al., 2012).

Os metais são diferentes de outras substâncias tóxicas pois, como elementos naturais constituintes da terra, não podem ser criados ou destruídos pelo ser humano. O seu nível de indestrutibilidade combinado com a sua capacidade de bioacumulação, contribui para aumentar o grau de preocupação na classificação dos metais como substâncias tóxicas (Casarett e Doull's, 2013).

Neste trabalho, devido ao tema em estudo, é conveniente realçar de entre todos os efeitos tóxicos, os efeitos a nível do sistema nervoso, ou seja, definir o conceito de neurotoxicidade. Esta pode ser definida como qualquer efeito adverso na estrutura ou função do sistema nervoso central (SNC) ou periférico (SNP), produzido por um agente biológico, químico ou físico, que diminui a capacidade de um organismo sobreviver, reproduzir-se ou adaptar-se ao seu ambiente. Os efeitos neurotóxicos



podem ser permanentes ou reversíveis, produzidos como resultados de acções directas e indirectas no sistema nervoso. Estes efeitos podem frequentemente ser avaliados através de técnicas neuroquímicas, neurofisiológicas, neuropatológicas, assim como recorrendo a estudos comportamentais (Slikker e Bowyer, 2005).

## 1.4 Manganês

O manganês (Mn) é um metal de transição, com número atómico 25, massa de 54,93 g/mol e densidade de 7.21-7.44 g/ dm<sup>3</sup>, dependendo da sua forma alotrópica. Foi primeiramente reconhecido por C. W. Scheele e col., e pela primeira vez isolado como metal livre por J.G. Gahn em 1774. O seu nome deriva do latim *magnes* devido a ter sido encontrado numa rocha magnética (Casarett e Doull's, 2013; Gerber et al., 2002).

O Mn pode ser encontrado nos solos, água, ar e alimentos e existe na forma orgânica e inorgânica, sendo que esta última é a mais comum no ambiente. É referenciado como sendo o décimo segundo elemento mais abundante na crosta terrestre e o quarto mais utilizado no mundo. Não ocorre naturalmente como metal isolado, mas é componente de mais de 100 minerais, sendo os mais comuns: o dióxido de manganês, o carbonato de manganês e o silicato de manganês (ATSDR, 2012; Gerber et al., 2002; Olanow, 2004; Rivera-Mancía et al., 2011; Santamaria, 2008)

O Mn pode apresentar 11 estados de oxidação. Em sistemas biológicos os estados Mn<sup>2+</sup> e Mn<sup>3+</sup> são predominantes, sendo o Mn<sup>2+</sup> o mais comum no organismo humano (Gerber et al., 2002; Horning et al., 2015; Michalke et al., 2007).

O Mn é um elemento essencial para os seres humanos, sendo componente de diversas enzimas, tais como a superóxido dismutase (SOD), a piruvato carboxilase e a glutamina sintetase. Assim, este elemento é essencial para uma variedade de funções metabólicas como o desenvolvimento ósseo, metabolismo energético, sistema imunitário, sistema endócrino e como antioxidante (Gerber et al., 2002; Jankovic, 2005; Rivera-Mancía et al., 2011; Santamaria, 2008).

---

### 1.4.1 Fontes de Exposição

---

Dado o carácter omnipresente do Mn é de considerar que a exposição da população a este elemento se faça através de diversas fontes. A população em geral está exposta ao Mn primeiramente através do consumo de alimentos, havendo alguns alimentos com concentrações particularmente elevadas como nozes, cereais, legumes, vegetais e chás. De um modo geral, o seu consumo através da água ingerida é substancialmente mais baixo do que através da alimentação. A exposição ao Mn através do ar pode ser negligenciada quando comparada com a exposição alimentar; contudo, certas actividades profissionais podem sujeitar o ser humano a níveis de exposição muito mais elevados quando comparados com a população em geral.

A presença de Mn na atmosfera ocorre devido a fontes naturais e antropogénicas. A erosão dos solos constitui a fonte natural mais relevante de Mn na atmosfera. A nível antropogénico, ocupações relacionadas com extracções de minérios, produção de aço e outras ligas metálicas e actividades de soldadura, são algumas das principais actividades responsáveis pela libertação deste elemento no ambiente. A queima de metilciclopentadienil manganês tricarbonilo (MMT), um aditivo da gasolina que ao sofrer combustão origina partículas inorgânicas deste elemento, pode ser uma das causas mais significativas da presença deste elemento na atmosfera (ATSDR, 2012; Dorman et al., 2006; Michalke et al., 2007).

Para além das actividades já mencionadas, existem outras aplicações deste elemento na sociedade actual que podem originar outro tipo de exposição humana, tais como: agente bactericida e fungicida, utilização na purificação de água, agente oxidante na produção de hidroquinona, fabrico de óculos, agente de branqueamento na indústria têxtil, em fósforos e fogo-de-artifício, produção de permanganato de potássio e outros químicos à base de Mn (Santamaria, 2008).

---

#### 1.4.2 Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção

---

A absorção do Mn ocorre na sua maioria através do tracto gastrointestinal, contudo a absorção através dos pulmões é preponderante a nível ocupacional. Mesmo quando os alimentos e água contêm grandes quantidades de Mn, os efeitos adversos não são geralmente reportados, excepto quando estivermos em presença de exposições repetidas, e quando existem patologias associadas a estas exposições. A maioria das situações estudadas refere-se a exposições ocorridas em ambientes ocupacionais (Michalke et al., 2007; Rivera-Mancía et al., 2011).

Normalmente apenas uma pequena fracção (1-5%) do Mn ingerido é absorvida, contudo, quando os níveis deste elemento no organismo se apresentam elevados a absorção gastrointestinal é reduzida. A absorção é influenciada, não só pela quantidade de Mn na dieta, mas também pela quantidade de ferro (Fe) e outros nutrientes no organismo, assim como pela idade do indivíduo. O Mn e o Fe são ambos elementos de transição, com massas atómicas, raio e estrutura electrónica semelhantes que permitem que o Mn compita directamente com o Fe. No caso particular da absorção ao nível do tracto gastrointestinal, um organismo que apresente carência em Fe apresenta-se como factor de risco, pois há um aumento da absorção de Mn e consequente incremento da distribuição do mesmo no organismo, incluindo no cérebro (Dorman et al., 2006; Horning et al., 2015; Zheng et al., 2010).

A absorção que ocorre ao nível dos pulmões está dependente do tamanho das partículas inaladas e da sua forma, que determinam a extensão e localização da deposição das mesmas nas vias respiratórias. As partículas mais pequenas tendem a ser depositadas nas vias aéreas inferiores, enquanto as partículas de maior dimensão ficam depositadas nas vias superiores. Cerca de 80% das partículas pequenas (0.1 a 2  $\mu\text{m}$ ) são removidas pela expiração. Partículas de tamanho superior podem ser expulsas dos pulmões através da expectoração e deglutição. A solubilidade das partículas pode também influenciar a quantidade absorvida pelo organismo, registando-se maior absorção para as partículas solúveis comparativamente às insolúveis (ATSDR, 2012; Jankovic, 2005; O'Neal e Zheng, 2015). O Mn inalado pode aceder ao bolbo olfactivo e assim tornar-se uma via directa de exposição do cérebro ao Mn. Vários estudos realizados em animais são consistentes na importância da absorção de Mn através do sistema olfactivo (ATSDR, 2012; Dorman et al., 2006; Neal e Guilarte, 2013).

O Mn pode ser encontrado em todos os tecidos de mamíferos, embora em concentrações variáveis. Tecidos ricos em mitocôndrias apresentam valores mais elevados de Mn, tais como o fígado, o pâncreas e os rins, mas é nos ossos que podemos encontrar o maior reservatório deste elemento no organismo. Tecidos ricos em pigmentos (retina, pele escura e cabelo) também podem apresentar valores mais elevados. A forma química do Mn é importante na forma como este estabelece ligações e é transportado no sangue. O transporte e distribuição do  $\text{Mn}^{2+}$  no organismo realiza-se fundamentalmente através da ligação à albumina (Casarett e Doull's, 2013; Dorman et al., 2006; Horning et al., 2015).

O principal meio de eliminação do Mn do organismo é através das fezes. Para que isto aconteça, este elemento é conjugado no fígado com a biliar e só então libertado no intestino, onde também pode sofrer reabsorção. A excreção pancreática também participa na eliminação deste elemento, mas em muito

menor escala. Concentrações inferiores de Mn podem ser encontradas na urina, suor e leite materno (ATSDR, 2012; Dorman et al., 2006).

---

### 1.4.3 Toxicidade Geral

---

A intoxicação aguda é rara, e a intoxicação crônica ocorre geralmente em ambientes ocupacionais, e em menor grau através do consumo de alimentos e água contendo concentrações elevadas de Mn. A exposição ao Mn em níveis elevados pode provocar diabetes, insuficiência renal, alterações hepáticas, problemas cardiovasculares, pulmonares e alterações neurológicas. Contudo, apesar dos diversos problemas mencionados anteriormente, os efeitos a nível do cérebro são os que mais preocupam a nível da saúde e aos quais foram dedicados um maior número de estudos. Estes efeitos serão analisados em maior detalhe no parágrafo seguinte (ATSDR, 2012; Gerber et al., 2002; Lares, 2010).

---

### 1.4.4 Neurotoxicidade e Seus Mecanismos

---

Apesar da essencialidade do Mn relativamente ao organismo humano, este elemento é conhecido como sendo neurotóxico há pelo menos 150 anos. Os sintomas foram primeiramente observados no âmbito ocupacional e até 1960 a maioria dos casos eram diagnosticados em mineiros. John Couper em 1837, foi o primeiro a reportar na literatura científica os efeitos neurológicos associados à exposição ocupacional ao Mn (Aschner et al., 2007; Finkelstein et al., 2007; Santamaria, 2008).

Vários mecanismos de toxicidade têm sido propostos de forma a explicar o potencial neurotóxico do metal em estudo, após exposição a elevadas concentrações. Devido aos seus vários estados de oxidação, o Mn consegue promover reacções de oxidação e consequentemente gerar espécies reactivas de oxigénio (ROS), sendo esta uma das hipóteses mais estudadas para a explicação da sua toxicidade. Entre outras hipóteses que explicam os seus efeitos neurotóxicos, é possível destacar as alterações na homeostasia do Fe, produção de inflamação e alterações no metabolismo da dopamina (DA) e do glutamato (ATSDR, 2012; Michalke et al., 2007; Rivera-Mancía et al., 2011).

A entrada do Mn no cérebro é feita através dos capilares cerebrais e/ou através do líquido cefalorraquidiano. Quando as concentrações plasmáticas se encontram dentro de valores normais este elemento chega ao SNC através das células endoteliais dos capilares da barreira hemato-encefálica (BHE); no entanto quando estes valores se apresentam elevados, a entrada é feita predominantemente através do plexo coróide (Aschner et al., 2007). O transporte de Mn para o cérebro é assim influenciado pela concentração deste elemento, pela natureza dos transportadores associados e pela sua interacção com a BHE (Michalke et al., 2007; Takeda, 2003).

Diversos estudos sugerem que a transferrina (Tf) e o transportador de metal divalente-1 (DMT-1) parecem ter um papel importante no transporte de Mn e na sua deposição no cérebro. Considera-se, no entanto, que o transporte de Mn através da Tf seja o principal sistema de transporte. Os locais de ligação da Tf conseguem, na ausência do Fe, acomodar outros metais, podendo no caso do metal em estudo, dois íões Mn (no estado  $Mn^{3+}$ ) ligarem-se a cada molécula (cerca de 100% do  $Mn^{3+}$  está ligado a Tf). Os receptores da Tf (TfR) estão presentes nos capilares do cérebro e no plexo coróide, sendo assim proposta a hipótese da entrada de Mn no cérebro através deste complexo (Aschner et al., 2007; O'Neal e Zheng, 2015; Rivera-Mancía et al., 2011; Takeda, 2003). O DMT-1 é uma proteína de transporte associada a membranas, que utiliza o gradiente dos prótons através das membranas celulares para transportar metais divalentes, incluindo o Mn, o Cu e o Fe. Este transportador é mais conhecido pelo seu papel na regulação do Fe. Sabe-se que mutações no gene NRAMP-2, homólogo nas bactérias

e leveduras, originam a interrupção do transporte de Mn, levando a considerar a sua participação neste mecanismo em Humanos. Outros estudos sugerem a participação deste transportador na entrada de Mn para o cérebro (Aschner et al., 2007; Horning et al., 2015; Takeda, 2003).

Outros transportadores associados ao transporte de Mn para o cérebro são as proteínas ZIP. O ZIP8 e ZIP14 encontram-se expressos no cérebro, contudo a sua localização celular ainda não é conhecida, nem a certeza da sua funcionalidade no transporte através da BHE (Aschner et al., 2007; O’Neal e Zheng, 2015; Rivera-Mancía et al., 2011; Takeda, 2003).

O sistema olfactório forma uma interface directa entre o SNC e o ambiente exterior, podendo servir como mecanismo de entrada directa do Mn inalado para o cérebro. O Mn consegue utilizar as sinapses e ser transportado através dos neurónios a partir da cavidade nasal até ao bulbo olfactivo e a outras estruturas cerebrais mais distantes (Dorman et al., 2006).

Existem diversos estudos que mostram que a exposição humana ao Mn pode levar ao aparecimento de uma síndrome neurológica, resultante da toxicidade deste elemento no SNC e habitualmente apelidada de Manganismo (ATSDR, 2012; Finkelstein et al., 2007). Geralmente os efeitos da exposição só são visíveis após vários anos de exposição a níveis médios ou elevados de Mn; contudo, alguns indivíduos podem, entretanto, sentir alguns sintomas inespecíficos tais como: cansaço, fraqueza, dores nas articulações e dores musculares, sensação de peso ou rigidez nas pernas, anorexia, nervosismo, dores de cabeça e sonolência. Com o progredir da doença, as dificuldades em andar começam a surgir, os músculos apresentam-se hipertónicos e os movimentos são acompanhados por tremores. Dificuldades na fala podem também ser sentidas. Para além destes sintomas existe um conjunto de patologias psiquiátricas que acompanham esta doença, conjunto usualmente apelidado como “*manganese madness*”. Os principais comportamentos observados são as alterações de humor, irritabilidade, alucinações e comportamentos obsessivos (ATSDR, 2012; Jankovic, 2005).

O Manganismo é frequentemente definido como uma desordem cujos sintomas se assemelham em muitos aspectos os sintomas clínicos da doença de Parkinson (DP). Alguns dos sintomas mais comuns em ambas as patologias são as perturbações na marcha, o aparecimento de rigidez, tremores e bradicinesia. Contudo, existem pequenas diferenças nos sintomas apresentados que revelam igualmente diferenças nas suas causas. No Manganismo a presença de tremor é menos comum do que nos casos de DP onde os tremores se verificam geralmente em repouso, contrariamente ao primeiro. No Manganismo é mais frequente a distonia, apresentando-se os efeitos mais simétricos e as dificuldades na marcha com características particulares, que levaram a sua designação como marcha “*cock-walk*”. Geralmente o tratamento com levodopa do Manganismo não apresenta resultados significativos, ao contrário do que sucede na DP. Estas diferenças estão relacionadas com as diferenças no modo como ambas as patologias afectam o cérebro. O Manganismo é caracterizado pela acumulação de Mn nas regiões dopaminérgicas com alto teor em Fe, mais especificamente nos gânglios basais (núcleo caudado, putâmen, globo pálido, substância negra e núcleo subtalâmico); o globo pálido é uma das áreas mais afectadas, enquanto a substância negra se mantém intacta. No caso da DP a substância negra é severamente danificada o que não sucede com o globo pálido. O Manganismo não está associado a formação de corpos de Lewy, uma característica histológica na DP (Olanow, 2004; Rivera-Mancía et al., 2011).

---

### 1.4.5 Estudos Ocupacionais

---

Neste ponto serão apresentados alguns estudos de exposição ao Mn em ambiente ocupacional. Estudos de âmbito ocupacional revelam que a exposição a metais em ambiente de trabalho pode levar a alterações a nível neurológico nos trabalhadores expostos nesses ambientes.

No que diz respeito ao Mn, num estudo realizado por Bowler e col., efectuado em trabalhadores de soldagem, registaram-se nas populações expostas várias alterações ao nível motor, um comprometimento das funções cognitivas, modificações ao nível do olfacto e aparecimento de sintomatologia respiratória. Foram ainda referidas alterações de humor, tais como ansiedade e depressão (Bowler et al., 2007). Num outro estudo ocupacional realizado igualmente numa população de soldadores que se encontravam expostos a fumos contendo Mn, pretendia-se estudar os efeitos a nível neurológico e neuropsicológico resultante desta exposição. Os resultados obtidos revelaram que existia uma maior prevalência de disfunções neuropsicológicas nos trabalhadores expostos do que nos controlo. Os trabalhadores expostos apresentaram piores resultados numa grande variedade de testes (motores, processamento visual e capacidade de concentração) aos quais foram submetidos a fim de se proceder a sua avaliação. Efeitos adversos na saúde como alterações neurológicas e mudanças de humor, eram também mais prevalentes neste grupo. Neste estudo pareceu também existir uma associação entre os resultados dos testes efectuados e disfunções motoras e de disposição (Bowler et al., 2006).

Em outro estudo realizado também em trabalhadores expostos a Mn através da inalação numa indústria de fundição, revelou resultados significativos na associação entre o aumento da exposição ao Mn e uma menor performance em alguns dos testes utilizados para avaliação neuropsicológica, tendo estes sido correlacionados com a idade, nível de educação e QI estimado (Summers et al., 2011).

## 1.5 Chumbo

O símbolo químico Pb apresenta-se como abreviatura do termo latim *plumbum*, que significa “prata líquida”. Pertence ao grupo 14 da Tabela Periódica, e possui número atómico 82 e peso atómico 207.19 (Torres, 2011).

O Pb possui propriedades tais como a sua maciez, elevada maleabilidade, baixo ponto de fusão (327.4 ° C), elevada resistência a corrosão, facilidade de formação de ligas metálicas, bom isolante sonoro e de radiações ionizantes, propriedades que levaram ao seu uso generalizado pelo Homem e que favoreceram a sua acumulação no ambiente, dada a sua natureza não biodegradável (Flora et al., 2012; Moreira, 2010).

O Pb existe sobre três formas: Pb metálico, Pb inorgânico (e seus compostos) e Pb orgânico. No seu estado elementar raramente ocorre no ambiente, mas sim no seu estado de oxidação Pb <sup>2+</sup> estando presente em vários minérios no ambiente (Sanders et al., 2009).

---

### 1.5.1 Fontes de Exposição

---

As principais actividades antropogénicas que favorecem a libertação de Pb no ambiente são a queima de combustíveis fósseis, a mineração e vários processos industriais. O Pb é usado em vários produtos, tais como nas baterias dos automóveis, munições, produtos metálicos (ex. canalizações e embalagens), aditivo de gasolina e tintas, em cerâmicas, cosméticos, entre outros (Sanders et al., 2009; Tchounwou

et al., 2012). Para além das fontes antropogénicas, a libertação de Pb na natureza também pode ocorrer de forma natural, sendo que as principais fontes de emissão são as actividades vulcânicas e o desgaste das rochas (Nordic Council of Ministers, 2003).

A exposição do Homem ocorre maioritariamente por ingestão de água ou alimentos contaminados e através da inalação de fumos ou poeiras contendo o metal em questão. Trabalhos relacionados com montagem de veículos, fabrico e reciclagem de baterias, soldagem, mineração, produção de ligas metálicas, indústrias de produção de óculos, plásticos, tintas e cerâmicas, são considerados como trabalhos com risco acrescido de exposição a Pb por parte dos seus trabalhadores (Tong et al., 2000).

Existe uma longa história de exposição de populações ao Pb em alimentos e bebidas. No tempo dos Romanos existem relatos de contaminação por este metal devido a utilização do mesmo para fabrico das condutas de água e nos recipientes de cerâmica para alimentos. Já mais tarde, antes da revolução industrial, a exposição a este elemento era relativamente baixa, mas a exploração de metais e a industrialização levaram a um aumento das emissões para o meio ambiente e concomitantemente ao incremento da exposição humana. A partir do século XX continuou um aumento das emissões, devido ao aparecimento dos veículos a motor e uso de combustíveis fósseis (Tong et al., 2000). A nível ocupacional, o problema da exposição a Pb é reconhecido há mais de 2000 anos. Efeitos a nível da saúde relacionados com o envenenamento por Pb tais como a anemia, cólicas e neuropatias foram identificados por Hipócrates e Nikande na era antes de Cristo. O controlo formal da exposição em trabalhadores não ocorreu antes de 1949, tendo sido Ronald Lane um pioneiro em saúde ocupacional (Gidlow, 2015; Mansouri e Cauli, 2009).

---

### 1.5.2 Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção

---

O Pb pode ser absorvido através do intestino e/ou pulmões dependendo da via de exposição. Após inalação, o Pb pode ficar depositado nos alvéolos (partículas inferiores a 1  $\mu\text{m}$ ) e passar para a corrente sanguínea; uma pequena parte (partículas superiores a 2.5  $\mu\text{m}$ ) pode ser transportada para a nasofaringe, onde será deglutida ou eliminada pela expectoração. Esta via de absorção é influenciada pelo tamanho das partículas, solubilidade, natureza orgânica ou inorgânica dos compostos de Pb e pela concentração deste elemento no ar inspirado. Estima-se que a percentagem de Pb inalado que chega à corrente sanguínea seja de 30% a 40 % (ATSDR, 2007a; Casarett e Doull's, 2013; Papanikolaou et al., 2005).

A absorção de Pb através do tracto gastrointestinal é afectada pelo estado fisiológico do indivíduo exposto: a idade, jejum, gravidez e o estado nutricional podem influenciar a taxa de absorção. As características dos compostos de Pb ingeridos tal como foi referido anteriormente, são também relevantes. Os adultos absorvem cerca de 10 a 15 % do Pb ingerido e as crianças podem absorver até 50%. A taxa de absorção também aumenta nas grávidas. Dietas pobres em Zn, Mn, Fe e Cálcio (Ca) aumentam a absorção de Pb (ATSDR, 2007a; Casarett e Doull's, 2013; Papanikolaou et al., 2005).

Uma pequena percentagem de Pb inorgânico pode ser também absorvida quando existe contacto do mesmo com a pele; em contraste, o Pb orgânico como o tetraetilchumbo (aditivo da gasolina), pode ser absorvido mais facilmente pela mesma. A absorção depende da integridade da pele e das características dos compostos de Pb, mas a taxa de absorção é sempre menor do que a que ocorre através da inalação ou ingestão (ATSDR, 2007a; Papanikolaou et al., 2005).

Após a absorção, o Pb vai ser distribuído principalmente por três compartimentos: sangue, tecidos moles e tecidos mineralizados. No sangue cerca de 99% do Pb encontra-se nos eritrócitos. É no plasma



que se localiza a fracção de Pb livre e disponível para difusão para outros tecidos. Cerca de 40 a 75% do Pb no plasma está ligado a proteínas, sendo a albumina a proteína que parece ter a ligação dominante. As concentrações de Pb no sangue (Pb-S) após exposição variam com a idade e estado fisiológico. No sangue, o período de semi-vida do Pb é de cerca de 30 dias (ATSDR, 2007a; Casarett e Doull's, 2013; Papanikolaou et al., 2005).

A presença de Pb nos tecidos moles tem um período de semi-vida de cerca de 40 dias, sendo os rins e o fígado os tecidos onde são encontradas concentrações mais elevadas (ATSDR, 2007a; Tchounwou et al., 2012; Torres, 2011).

Apesar da existência de vários locais de acumulação, o principal é o tecido ósseo (cerca de 94 % em adultos). É também neste tipo de tecido que se encontra o período de semi-vida mais longo, estando estimado em cerca de 20 a 30 anos. A distribuição de Pb nos ossos não é uniforme, tendo este elemento tendência a acumular-se em locais onde existe mais calcificações na altura da exposição. É necessário referir que em certas condições, como por exemplo na gravidez, aleitamento e na presença de osteoporose, o tecido ósseo pode tornar-se uma fonte de exposição endógena, contribuindo para o aumento de Pb em circulação (ATSDR, 2007a; Casarett e Doull's, 2013; Papanikolaou et al., 2005).

Independentemente da via de exposição, a maior percentagem de Pb excretado pode ser encontrada na urina, usualmente através de filtração glomerular no tracto urinário, podendo também sofrer reabsorção ao nível tubular. A excreção gastrointestinal ocorre em menores quantidades e corresponde à porção que não foi absorvida a nível intestinal. O suor, saliva, cabelo, unhas e leite materno são consideradas vias de excreção pouco significativas (ATSDR, 2007a; Casarett e Doull's, 2013).

---

### 1.5.3 Toxicidade Geral

---

A presença de Pb no organismo afecta diversos órgãos e tecidos. Os principais sistemas afectados são o renal, imunitário, endócrino, reprodutor, cardiovascular, gastrointestinal, hematopoiético e nervoso. Em seguida serão mencionados alguns dos efeitos mais referidos na literatura, sendo o sistema nervoso abordado separadamente.

A nível gastrointestinal é necessário mencionar as cólicas como um dos principais sintomas de envenenamento por Pb; estes podem ser caracterizados por dor abdominal, náuseas e vómitos, obstipação, diarreia e perda de peso. Os sintomas gastrointestinais costumam ocorrer para valores de Pb na ordem de 100-200 µg de Pb/dl no sangue, mas podem acontecer para valores mais baixos (ATSDR, 2007a; Casarett e Doull's, 2013; Graeme e Pollack, 1998a).

Relativamente aos efeitos tóxicos ao nível do sistema renal, estes são caracterizados por dois tipos de lesão: alterações tubulares agudas (proximais) que podem ser reversíveis, e a nível crónico a fibrose intersticial com perda de nefrónios e falência renal. Estas patologias podem resultar na redução da taxa de filtração glomerular observando-se aminoacidúria, glicosúria, hiperfosfatúria e proteinúria (ATSDR, 2007a; Graeme e Pollack, 1998a)

No sistema cardiovascular foram observados danos cardíacos e vasculares, sendo a hipertensão um dos efeitos mais associados a casos de exposição a Pb. Entre outras doenças é possível enumerar a cardiopatia isquémica, acidentes vasculares cerebrais e doença arterial periférica (Casarett e Doull's, 2013; Flora et al., 2012).

A exposição a Pb nos homens pode diminuir a libido, provocar alterações na espermatogénese e no funcionamento da próstata. Nas mulheres, a probabilidade de hipertensão e pré-eclampsia durante a

gravidez aumenta, assim como o risco de parto prematuro e aborto. Pode igualmente ocorrer a infertilidade em ambos os géneros (Flora et al., 2012).

O Pb consegue afectar directamente o sistema hematopoiético diminuindo a síntese de hemoglobina, através da inibição de várias enzimas envolvidas neste processo. O Pb interfere nesta síntese ao alterar a actividade do ácido  $\delta$ -aminolevulínico desidratase (ALAD) e da ferroquelatase, fundamentalmente. Como consequências destas alterações vai existir um aumento das porfirinas, das coproporfinas e do ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA) na urina (ALA-U), que resulta do aumento do ALA no sangue e plasma. A síntese do heme fica assim diminuída. O Pb apresenta também a capacidade de reduzir o tempo de vida dos eritrócitos circulantes ao aumentar a fragilidade das suas membranas celulares. Destas alterações pode resultar uma anemia com duas características, anemia microcítica e hipocrómica (ATSDR, 2007a; Casarett e Doull's, 2013; Flora et al., 2012).

#### ▪ Mecanismos de Toxicidade

Os mecanismos de toxicidade do Pb estão relacionados com a sua capacidade de se ligar a várias moléculas biológicas e desta forma interferir com as suas funções (Tchounwou et al., 2012).

O Pb tem a capacidade de formar complexos estáveis com ligantes contendo enxofre, fósforo, azoto ou oxigénio (grupos  $-SH$ ,  $-H_2PO_3$ ,  $-NH_2$ ,  $-OH$ ), que funcionam como fornecedores de electrões (Sousa, 2010). A interferência do Pb nos mecanismos iónicos, devido a sua capacidade em ligar-se aos catiões  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  e  $Na^+$ , justificam outros mecanismos de toxicidade, podendo originar efeitos nefastos na maturação de proteínas, na comunicação intra- e intercelular, na apoptose, no transporte de iões, na regulação enzimática e na libertação de neurotransmissores (Jaishankar et al., 2014).

Um dos mecanismos referido como sendo um dos principais responsáveis pela toxicidade do Pb é a sua capacidade de provocar stress oxidativo; assim, podem suceder: 1). a geração de ROS, como o hidroperoxilo ( $HO_2$ ), o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e o oxigénio singlete; 2). a redução dos níveis de antioxidantes. O Pb reduz os níveis de glutathiona (GSH), um dos antioxidantes mais importantes encontrados nas células, ligando-se ao seu grupo  $-SH$ . O Pb também inactiva enzimas como a glutathiona redutase (GR), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona-s-transferase e ALAD, contribuindo também para a redução dos níveis de GSH. Outras enzimas antioxidantes igualmente inibidas pelo Pb são a SOD e a catalase (CAT) (Flora et al., 2012).

---

### 1.5.4 Neurotoxicidade e Seus Mecanismos

---

O sistema nervoso é um dos órgãos mais sensíveis a toxicidade produzida pelo Pb tanto a nível do SNC como do SNP. O SNC, muito afectado em crianças, apresenta como efeito mais comum em casos de intoxicação aguda, a encefalopatia, sendo esta caracterizada por irritabilidade, dificuldades de atenção, dores de cabeça, tremores, perda de memória e alucinações. Os sintomas mais severos ocorrem em presença de elevados níveis de exposição e podem resultar em delírios, paralisia, coma e até mesmo a morte (Flora et al., 2012; Mason et al., 2014; Moreira, 2010). No SNP, a situação clínica mais comum é a neuropatia periférica, sendo também a manifestação mais habitual a nível ocupacional. Esta é caracterizada pela diminuição da velocidade de condução nervosa (ATSDR, 2007a; Jarup, 2003; Moreira, 2010). A exposição ocupacional a Pb está também associada a défices na capacidade de compreensão, aprendizagem e memória. Apresentam-se também dificuldades nas funções cognitivas complexas, entre as quais as que se relacionam com as componentes motoras, tais como o tempo de reacção, destreza e funcionamento visual-motor. Outros efeitos como a diminuição



da força muscular, a diminuição do equilíbrio postural e em marcha, e ataxia, também foram relatados (Mansouri e Cauli, 2009).

A nível neuropatológico os efeitos crónicos da exposição a Pb incluem inchaço e necrose das células endoteliais dos capilares cerebrais levando a edema cerebral causado pelo aumento do vazamento capilar, perda de células neuronais, vacuolização citoplasmática, cromatólise, e desmielinização das fibras nervosas. Estruturalmente a nível sub-celular e celular a intoxicação por Pb provoca alterações nas mitocôndrias, no aparelho de Golgi e nos astrócitos (Nava-Ruiz et al., 2012). As células endoteliais são as primeiras expostas ao Pb após a sua passagem do sangue para o cérebro; estas células demonstram uma elevada afinidade para este metal, resultando concentrações mais elevadas neste tipo de células, em especial nas mitocôndrias (Nava-Ruiz et al., 2012; Zheng et al., 2003). O Pb acumula-se também no plexo coróide em maior extensão do que nas células endoteliais. As concentrações de Pb neste local do cérebro podem estar relacionadas com alterações selectivas na barreira entre o sangue e o fluido cérebroespinal (Zheng et al., 2003).

Relativamente à passagem da BHE pelo Pb, uma das hipóteses colocadas é a do transporte passivo de  $Pb^{2+}$  ou de compostos simples de Pb, e a capacidade deste elemento atravessar membranas celulares através dos canais de  $Ca^{2+}$  (Marchetti, 2003; Zheng et al., 2003).

Os mecanismos através dos quais o Pb origina neurotoxicidade são diversos. O stress oxidativo, alterações biofísicas das membranas, desregulação dos sinais celulares e danos na neurotransmissão são os aspectos chave que podem justificar a neurotoxicidade do Pb (Sanders et al., 2009).

Uma das hipóteses explicativas dos efeitos neurotóxicos do Pb relaciona-se com um processo, não mediado directamente por este, mas indirectamente pela acumulação de ALA nas células cerebrais, que iria competir com o neurotransmissor ácido gama aminobutírico (GABA) (Moreira, 2010; Torres, 2011). O Pb interfere também com outros sistemas de neurotransmissão, para além do GABAérgico, tais como o dopaminérgico e o colinérgico, podendo estes também estarem envolvidos nos processos que conduzem à neurotoxicidade (Flora et al., 2012; Marchetti, 2003; Mason et al., 2014).

O Pb tem a capacidade de imitar e/ou desregular a homeostasia do Ca. Assim, estando o Ca envolvido em vários processos celulares, não é surpreendente o surgimento de diversos efeitos abaixo mencionados. Duas das vias dependentes de Ca que mais interesse tem suscitado são a da calmodulina (CaM) e da proteína cinase C (PKC). Quando o Ca extracelular entra na célula este combina-se com a CaM, um mensageiro secundário, que actua em diversas vias de sinalização celular. O Pb tem uma elevada afinidade para a CaM mesmo em baixas concentrações. Desta forma o Pb vai também promover a activação da CaM, desencadeando vários processos dependentes da mesma, entre os quais processos de fosforilação e desfosforilação, alteração do equilíbrio de formação e degradação de proteínas sinalizadoras, tais como o AMP cíclico ou o óxido nítrico. Também participa na modulação de diversos canais iónicos, tais como o ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), os canais de Ca e os canais de potássio (Brochin et al., 2008; Marchetti, 2003; Nava-Ruiz et al., 2012; Sanders et al., 2009; Torres, 2011). A PKC está envolvida na transmissão sináptica, síntese de neurotransmissores e na ramificação dendrítica, entre outras funções. O Ca é o activador fisiológico natural da PKC, mas a capacidade de o Pb substituir o Ca na activação desta proteína foi também implicada como um possível mecanismo de neurotoxicidade (ATSDR, 2007a; Brochin et al., 2008; Nava-Ruiz et al., 2012; Sanders et al., 2009).

---

### 1.5.5 Estudos Ocupacionais

---

A literatura refere vários estudos relativos à exposição ao Pb no âmbito ocupacional. Assim, num estudo realizado em 59 trabalhadores, 31 pertencentes a uma companhia de produção de baterias e os restantes com actividades relacionadas com a fundição de Pb, foram realizados um conjunto de testes neuro-comportamentais a fim de serem avaliados os efeitos da exposição a baixos níveis de Pb no sistema nervoso, a nível ocupacional. Os resultados obtidos revelaram que a maioria das funções neurológicas avaliadas indicaram um agravamento no grupo exposto. O sistema visual também apresentou alterações sendo este aspecto colocado como hipótese explicativa para a diminuição da performance noutros parâmetros avaliados. A memória foi outro dos parâmetros onde se observaram perturbações na população exposta (Williamson e Teo, 1986).

Um outro estudo comportamental foi também realizado em trabalhadores expostos numa indústria de fundição de Pb e numa fábrica de vidro, com o objectivo de avaliar os efeitos da exposição a baixos teores de Pb, utilizando para isso um conjunto de testes da Organização Mundial de Saúde (OMS), que compreendem, um questionário e um conjunto de sete testes que avaliam o tempo de reacção simples, memória de curto prazo, disposição, coordenação manual-visual e velocidade perceptiva. No geral, na maioria dos testes efectuados, o grupo exposto apresentou piores performances. Os registos realizados relativos ao estado de espírito dos participantes também revelaram alterações que estavam correlacionadas com as concentrações de Pb-S (Maizlish et al., 1995).

Trabalhadores de uma fábrica de baterias foram avaliados para se estudar os efeitos da exposição a Pb através de testes psicológicos e de sintomas subjectivos de bem-estar relatados pelos indivíduos participantes no estudo; neste estudo considerou-se que os valores de Pb-S nunca foram superiores a 60 µg/ 100 ml, tendo o grupo exposto sido comparado com trabalhadores com níveis mais baixos de Pb-S (inferior a 35 µg/100 ml) e com grupos controlo. As alterações mais significativas foram observadas nos testes efectuados nos trabalhadores com valores entre 45 a 60 µg/ 100 ml de Pb-S, comparativamente aos outros dois grupos, para além de se verificarem um maior número de queixas de sintomatologia física. As diferenças não aparentavam estar relacionadas com as restantes características recolhidas sobre a população (Campara et al., 1984).

Noutro estudo de exposição crónica a Pb, realizado em 49 indivíduos com concentrações de Pb-S entre os 1,3 e 3,3 µmol/L, foi comparado com outros trabalhadores com níveis de Pb mais baixos. Foram ainda realizados vários testes neuropsicológicos e avaliados os sintomas neuropsiquiátricos experienciados. Como resultados foram observadas alterações mais significativas no grupo exposto que no controlo, principalmente nos testes de avaliação da memória, aprendizagem, tempo de reacção visual e ainda na apresentação de sintomas subjectivos (Hogstedt et al., 1983).

## 1.6 Arsénio

O nome Arsénio deriva da palavra grega *arsenikon* e significa “pigmento amarelo”. O As apresenta-se com número atómico 33 na Tabela Periódica dos elementos e é classificado como sendo um metalóide, visto apresentar características de metal e de não metal; contudo é frequentemente referido como um metal e no contexto da toxicologia como um metal pesado. Neste trabalho, por questões de facilidade de linguagem, será mencionado como metal. Os estados de oxidação mais comuns são o As<sup>5+</sup> e As<sup>3+</sup> e pode apresentar-se sobre a forma orgânica e inorgânica, tanto no ambiente como no organismo humano; como exemplos de compostos inorgânicos de As temos os arsenitos e arseniats, e

de compostos orgânicos de As a arsina e os seus derivados orgânicos (Graeme e Pollack, 1998b; Tchounwou et al., 2012);

---

### 1.6.1 Fontes de Exposição

---

A maioria do As encontrado no ambiente está presente nas rochas e no solo, mas também se encontra presente nas águas e no ar. Várias são as fontes antropogénicas de As como a produção de energia fóssil, fundição de metais, produção e uso de pesticidas, tratamento de madeiras e queima de desperdícios agrícolas. Como fontes naturais estão incluídos fenómenos como as actividades vulcânicas e a erosão dos solos (Graeme e Pollack, 1998b; Jarup, 2003; Tchounwou et al., 2012).

A população em geral está maioritariamente exposta através da ingestão de alimentos e de água. Os alimentos são uma das fontes mais importantes, mas em determinadas zonas a contaminação da água com As faz com que a exposição através desta via se torne mais significativa. É estimado que vários milhões de pessoas são expostas cronicamente ao As, especialmente em países como a Índia, o México, Taiwan, Bangladesh, China, onde em algumas zonas destes países as águas estão contaminadas com este elemento. O As nos alimentos apresenta-se geralmente na forma de compostos orgânicos não tóxicos, sendo os frutos do mar, o peixe e as algas as maiores fontes desta forma de As. A contaminação dos solos é também uma potencial fonte de exposição a As. A exposição através da inalação ocorre geralmente em ambientes ocupacionais, sendo que trabalhadores que produzem e utilizam compostos de As são os mais susceptíveis a este tipo de exposição (Jarup, 2003; Ratnaike, 2003; Rodríguez et al., 2003; Tchounwou et al., 2012).

Ao longo dos séculos o As teve uma vasta variedade de utilizações. A utilização médica do As remonta aos tempos da Antiga Grécia e Roma. Foi utilizado como curativo após médicos gregos como Hipócrates e Galen popularizarem a sua utilização. Muitos séculos mais tarde, compostos de As ficaram disponíveis em soluções, pastas, comprimidos, e na forma injectável. A solução de Fowler, muito utilizada durante o século XIX, foi utilizada no tratamento de várias doenças como a malária, asma, psoríase, eczema, sífilis e leucemias. Em 1910, Paul Ehrlich, introduziu um novo medicamento com As, chamado Salvarsan, que se tornou popular no tratamento da sífilis e foi usado até a penicilina se tornar mais usual, em 1940 (Graeme e Pollack, 1998b; Hughes et al., 2011; Ratnaike, 2003). Actualmente o As continua a ter alguns fins terapêuticos. O trióxido de As ( $As_2O_3$ ) é muito utilizado no tratamento de alguns tipos de leucemias, baseado na sua capacidade de promover a apoptose. O As é ainda hoje um constituinte essencial de vários produtos médicos da medicina não-ocidental (Ratnaike, 2003).

Para além das utilizações médicas, quer passadas ou presentes, o As foi também utilizado como constituinte de cosméticos e usado na agricultura de forma mais intensa do que no presente. Teve também aplicações como pigmento em tintas e antes da descoberta da electricidade foi utilizado para a iluminação. Por fim, uma das suas utilizações mais conhecidas, e que ganhou notoriedade na Idade Média, foi a sua utilização como agente suicida ou homicida dadas as suas características insípidas, inodoras e a sua eficácia (Hughes et al., 2011; Ratnaike, 2003).

---

### 1.6.2 Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção

---

O As pode ser absorvido após ingestão, inalação ou percutaneamente. A absorção no tracto respiratório é muito dependente da solubilidade e tamanho das partículas. A absorção através dos pulmões ocorre após deposição das partículas neste órgão e posterior absorção das mesmas partículas

através da superfície dos pulmões (ATSDR, 2007b; Graeme e Pollack, 1998b; Jarup, 2003). A exposição oral ocorre principalmente através da ingestão de alimentos ou água contaminados como referido anteriormente. Sabe-se que os compostos inorgânicos de As são bem absorvidos através do tracto gastrointestinal (80-90 %) (Casarett e Doull's, 2013; Rodríguez et al., 2003). A pele pode também servir como potencial via de exposição e absorção de As, sendo que este órgão é um dos mais susceptíveis à exposição a este metal, estando também associado a várias patologias, entre elas o cancro (Casarett e Doull's, 2013; Graeme e Pollack, 1998b).

O As liga-se a porção globina da hemoglobina dos eritrócitos, e depois distribui-se pelo fígado, rins, baço, pulmões, tracto gastrointestinal e sistema nervoso, em menos de 24 horas. Duas ou quatro semanas após a ingestão de As, este é incorporado nas unhas, cabelos e pele (Graeme e Pollack, 1998b; Rodríguez et al., 2003).

No processo de metilação o  $As^{5+}$  é reduzido a  $As^{3+}$ , um processo que parece ser mediado pela GSH. A maioria do  $As^{3+}$  formado é distribuído pelos tecidos e entra nas células (principalmente nos hepatócitos). De modo geral, as células parecem acumular mais rapidamente  $As^{3+}$  do que  $As^{5+}$ . O  $As^{3+}$  sequencialmente metilado, dá origem a metabolitos como o ácido monometilarsénico (MMA) e o ácido dimetilarsénico (DMA), ambos menos reactivos com os constituintes dos tecidos do que o As inorgânico. Vários estudos sugerem que o fígado é um local importante para a metilação do As, especialmente após ingestão, podendo este processo também ocorrer noutros tecidos. Para que este processo possa ocorrer, é necessário a presença da metiltransferase (AS3MT) e a doação de um grupo metilo, considerando-se a S-adenosilmetionina (SAM) a fonte desse grupo. O processo de metilação inclui múltiplos intermédios, sendo que alguns destes são mais reactivos do que o As inorgânico, como por exemplo os metabolitos trivalentes MMAIII e DMAIII. Em Humanos, após excreção urinária, a maioria dos compostos de As encontrados são o MMA ou DMA (ATSDR, 2007b; Casarett e Doull's, 2013; Hughes, 2002; Vahter, 2002).

A excreção do As absorvido é feita essencialmente através da urina. Do As ingerido cerca de 50 a 80 % é excretado em 3 a 5 dias. A excreção de As inorgânico através das fezes é muito reduzida. O As ingerido pode ainda ser eliminado através da bÍlis após formação de complexos com a GSH. Cerca de 30 a 60 % do As inorgânico inalado é excretado na urina. O As é também excretado por descamação da pele e através do suor, unhas e cabelo (ATSDR, 2007b; Casarett e Doull's, 2013; Ratnaike, 2003; Rodríguez et al., 2003).

---

### 1.6.3 Toxicidade Geral

---

A maioria dos casos de intoxicação aguda reportados dizem respeito a ingestões acidentais de As através de pesticidas e, actualmente de forma menos comum, em tentativas de suicídio. A ingestão de doses elevadas (70-180 mg) de As inorgânico podem ser fatais para o Homem. Os sinais clÍnicos iniciais de intoxicações agudas estão principalmente relacionados com o tracto gastrointestinal e incluem náuseas, vÓmitos, cólicas, dor abdominal, salivação excessiva e diarreias, sendo a diarreia o sintoma predominante. Estes sintomas tendem a melhorar em pouco tempo após o final da exposição (ATSDR, 2007b; Casarett e Doull's, 2013; Ratnaike, 2003). Outros possíveis sintomas incluem febre, psicose, erupções cutÍneas difusas, hepatomegalia, convulsões, anomalias hematolÓgicas, problemas respiratÓrios e cardÍacos (Casarett e Doull's, 2013; Ratnaike, 2003).

Na exposição crónica, o As absorvido acumula-se principalmente no fígado, rins, coração, pulmões e em menores quantidades nos músculos, sistema nervoso, tracto gastrointestinal e baço (Ratnaike, 2003). A pele é um dos principais alvos na exposição crónica a As inorgânico e, como referido

anteriormente, um dos órgãos mais afectados pelo mesmo (Casarett e Doull's, 2013). O As deposita-se nos tecidos ricos em queratina, tais como a pele, cabelo e unhas. Registam-se mudanças dermatológicas que são características e por isso utilizadas como diagnóstico inicial da exposição a As, baseando-se na hiperpigmentação e hiperqueratose palmo-plantar. Uma outra manifestação de uma intoxicação por As é o aparecimento das linhas de Mees, linhas brancas transversais, nas unhas dos pés e mãos. Outros efeitos apresentados são eritemas, dermatites e descamação da pele (Graeme e Pollack, 1998b; Ratnaike, 2003).

No tracto gastrointestinal para além dos sintomas já apresentados, é também necessário considerar a irritação das membranas mucosas, evidente devido a formação de vesículas e descamação, sensação de gosto metálico, aroma a alho na respiração, disfagia e gastroenterite hemorrágica; em casos mais graves podem ser observados danos hepatocelulares que podem resultar em icterícia, aumento do tamanho do fígado podendo evoluir para cirrose e carcinomas hepatocelulares (Casarett e Doull's, 2013; Graeme e Pollack, 1998b; Jomova et al., 2011).

O sistema cardiovascular também é afectado pela exposição ao As. A exposição crónica pode levar a alterações na despolarização do miocárdio e a arritmias cardíacas. Outro efeito associado é a hipertensão, assim como as doenças vasculares periféricas (ATSDR, 2007b; Jomova et al., 2011; Ratnaike, 2003). Um dos melhores exemplos dos efeitos do As ao nível das doenças vasculares periféricas, é a doença de “*blackfoot*” endémica em Taiwan, e associada a ingestão de água contaminada (ATSDR, 2007b; Graeme e Pollack, 1998b).

Ao nível de efeitos no sistema respiratório, em situações agudas após ingestão de As inorgânico, foram relatadas dificuldades respiratórias, edema pulmonar e bronquite hemorrágica, podendo estes surgirem após os efeitos vasculares. Apneia devido a danos no nervo frénico foi também associada a este tipo de exposição (ATSDR, 2007b; Graeme e Pollack, 1998b). Trabalhadores expostos a poeiras contendo As inorgânico muitas vezes experienciam irritação nas membranas mucosas do nariz e garganta, podendo levar a laringites, bronquites e rinites (ATSDR, 2007b). Um excesso no número de cancro pulmonares reportados em trabalhadores expostos cronicamente a As tem sido também observado (Graeme e Pollack, 1998b).

Ao nível renal, a maioria dos estudos em casos de exposição oral aguda ou crónica a As inorgânico, não reportam sinais clínicos de danos significativos neste sistema. Foram, no entanto, reportados alguns casos de indivíduos com níveis mais elevados de creatinina, bilirrubina e proteinúria. Estudos em animais sugerem também que os rins não são o principal alvo de toxicidade do As inorgânico. No que diz respeito ao As orgânico, estudos *in vivo* reportaram efeitos na bexiga e ao nível renal após exposição oral ao mesmo. A informação disponível sugere que o sistema urinário é mais sensível ao DMA que ao MMA (ATSDR, 2007b; Jomova et al., 2011).

O sistema hematopoético é também um dos sistemas afectados pelo As. A hemólise dos glóbulos vermelhos pode ocorrer após intoxicação aguda, e pancitopenia pode resultar de exposições agudas e crónicas. A anemia e leucopenia são efeitos comuns em intoxicações por As inorgânico em Humanos. Os efeitos podem ser resultado directo dos efeitos citotóxicos e hemolíticos nas células do sangue e da redução da eritropoiese. A anemia é geralmente normocítica e normocrómica. A anemia aplástica, ocasionalmente progredindo para leucemia mieloide aguda pode surgir após exposições crónicas (ATSDR, 2007b; Graeme e Pollack, 1998b).

A exposição a As foi também associada ao aumento do risco de diabetes mellitus. Efeitos adversos no sistema nervoso são também observados após exposições ao As, mas este tema, será desenvolvido mais a frente (ATSDR, 2007b; Jomova et al., 2011).

## ▪ Mecanismos Toxicidade

A toxicidade do As é influenciada pelo seu estado de oxidação, solubilidade assim como outros factores intrínsecos e extrínsecos. A maioria dos casos reportados de toxicidade humana induzida pelo As está relacionada com exposições a As inorgânico (Tchounwou et al., 2012). O processo de metilação de espécies de As inorgânico foi considerado como um processo de desintoxicação, contudo recentemente foram identificados metabolitos produzidos neste processo que podem originar toxicidade no organismo.

O As  $^{5+}$  consegue substituir o fosfato em várias reacções químicas, pois possui uma estrutura e propriedades semelhantes a este. O As  $^{5+}$  reage *in vitro* com a glucose e o gluconato para formar glucose-6-arsenato e 6-arsenogluconato, compostos semelhantes à glucose-6-fosfato e 6-fosfogluconato. O As  $^{5+}$  pode também substituir o fosfato na bomba de sódio e no sistema de transporte de aniões das células vermelhas no ser Humano. Os níveis de adenosina trifosfato (ATP) podem ser diminuídos pelo As $^{5+}$  (ATSDR, 2007b; Hughes, 2002; Hughes et al., 2011).

O As  $^{3+}$  reage *in vitro* com moléculas contendo grupos tiol tais como a GSH e a cisteína. A ligação de compostos metilados de As  $^{3+}$ , tais como o MMAIII são potentes inibidores da GR e tioredoxina redutase. Foi sugerido que a ligação do As  $^{3+}$  e dos compostos trivalentes metilados a grupos tiol críticos pode levar a inibição de reacções bioquímicas, alteração do estado de *redox* celular e eventual citotoxicidade; contudo, a ligação destes compostos a locais não essenciais de proteínas pode servir como mecanismo de desintoxicação. O As  $^{3+}$  inibe também a piruvato desidrogenase (PDH), um complexo que oxida o piruvato em acetilcoenzima A (Acetil-CoA), um dos precursores intermediários do Ciclo de Krebs que proporciona equivalentes redutores para o sistema de transporte de electrões e para a produção de ATP (ATSDR, 2007b; Hughes, 2002; Jomova et al., 2011).

Vários estudos de toxicidade do As sugerem o papel das ROS na origem da toxicidade do As inorgânico, sendo este um dos mecanismos mais estudados. As principais ROS induzidas pelo As são os radicais superóxido, peróxido de hidrogénio, oxigénio *singlet* e radicais peróxido. Resultados de estudos *in vitro*, *in vivo* e em humanos, sugerem o envolvimento do As no aumento da peroxidação lipídica, produção de superóxido, formação de radicais hidroxilo, sulfidrilos não proteicos no sangue e/ou danos no ácido desoxirribonucleico (ADN). A diminuição das defesas antioxidantes celulares resulta num aumento da susceptibilidade à toxicidade do As. Os mecanismos através dos quais são produzidas as ROS ainda não são totalmente claros, tendo sido colocadas várias hipóteses. As ROS estão envolvidas em vários processos (alterações na transmissão de sinais, na proliferação e apoptose celular, alteração da actividade mitocondrial e de enzimas, entre outros) que estão associados ao desenvolvimento de diversas doenças e que por sua vez servem para justificar alguns dos processos de toxicidade do mesmo (ATSDR, 2007b; Flora, 2011; Hughes et al., 2011; Jomova et al., 2011; Tchounwou et al., 2012). Para além das ROS, também as espécies reactivas de azoto (RNS), parecem estar directamente envolvidas na produção de danos oxidativos em lípidos, proteínas e no ADN de células expostas ao As (Valko et al., 2005).

O potencial carcinogénico do As foi reconhecido há 110 anos por Hutchinson. O As e os compostos inorgânicos de As são considerados pela “International Agency for Research on Cancer” (IARC) como carcinogénicos para os humanos (Grupo 1). Os compostos DMA e MMA são considerados como possíveis carcinogénicos para o ser humano (Grupo 2B) (Casarett e Doull’s, 2013). Vários mecanismos de acção têm sido propostos para explicar este potencial, tais como a indução de danos oxidativos, inibição da reparação e alterações nos processos de metilação do ADN, aneuploidia, amplificação genética, indução de anomalias cromossómicas, alterações na transdução de sinais, alteração de factores de crescimento e aumento da proliferação celular. Existem evidências suficientes

em Humanos para a classificação de carcinogenicidade em misturas de compostos inorgânicos de As. Cancro dos pulmões, bexiga e pele são os tipos de cancro mais relacionados com a exposição a compostos inorgânicos de As. Foram, no entanto, feitas outras associações positivas entre a exposição aos mesmos compostos e o aparecimento de cancro no fígado, rim e próstata (Hughes, 2002; Hughes et al., 2011; IARC., 2012; Tchounwou et al., 2012).

---

#### 1.6.4 Neurotoxicidade e Seus Mecanismos

---

Os efeitos neurológicos induzidos pelo As em humanos têm vindo a ser conhecidos maioritariamente através da descrição de casos isolados comparativamente a realização de estudos epidemiológicos. Dependendo da dose, duração e via de exposição, as disfunções provocadas pelo As podem variar deste distúrbios neuro-comportamentais, danos cognitivos e de memória, defeitos sensoriais ao nível da audição e visão, neuropatias e encefalopatias (Flora, 2011; Ratnaike, 2003).

A exposição a compostos inorgânicos de As pode levar a efeitos neurológicos após inalação ou via oral. A neuropatia periférica é uma das patologias mais comuns na exposição a As. Exposições repetidas a baixas concentrações de As inorgânico podem levar a esta patologia, que nos estádios iniciais é caracterizada por dormência nas mãos e pés podendo mais tarde evoluir para sensações dolorosas de picadas de “alfinetes e agulhas”. Ambos os nervos motores e sensoriais são afectados e a fraqueza muscular pode também ser sentida (Casarett e Doull's, 2013; Jomova et al., 2011; Ratnaike, 2003).

Estudos mais antigos já revelavam os efeitos da exposição a As ao nível do sistema nervoso. A utilização de compostos deste metal, revelavam que em quase todos os casos de pacientes que tratavam a sífilis sofriam complicações com o tratamento, incluindo o desenvolvimento de distúrbios neurológicos, e em casos graves levando a morte. Esta patologia era chamada “*arsphenamine encephalitis*”, “*hemorrhagic encephalitis*” ou “*brain purpura*” (Rodríguez et al., 2003).

O mecanismo através do qual o As atinge o cérebro não está ainda definido. Este elemento tende a acumular-se no plexo coróide, talvez para proteger o cérebro da entrada deste elemento (Rodríguez et al., 2003). Estudos relativos aos mecanismos de neurotoxicidade revelaram que o As tem impacto em vários processos e sistemas neurobiológicos, tais como a neurogénese, sistema colinérgico, sistema glutamatérgico e monoaminérgico (Tyler e Allan, 2014).

É importante referir que o hipocampo é uma das partes do cérebro mais afectadas pelo As; este induz défices em vários padrões de aprendizagem, principalmente aqueles que necessitam de um funcionamento adequado desta estrutura. Estudos que usaram modelos animais revelaram alterações nas funções, na morfologia e na sinalização do hipocampo, levando consequentemente a alterações cognitivas após exposição a As. Estudos comportamentais que avaliaram tarefas dependentes do hipocampo corroboram as evidências das alterações cognitivas em Humanos expostos a As (Tyler e Allan, 2014).

Vários estudos reportam os efeitos dos compostos de As<sup>5+</sup> e As<sup>3+</sup> no sistema colinérgico, referindo alterações da actividade da acetilcolinesterase (AChE) e da colina acetiltransferase (ChAT) após a exposição aos mesmos. Estudos em ratos referem um decréscimo da actividade AChE na medula espinal e em várias partes do cérebro (tronco cerebral, hipotálamo e cerebelo) após exposição repetida a As, através da ingestão de água contaminada. Em algumas zonas do cérebro de rato analisadas após exposição, o As inibiu a síntese, libertação e recaptação de acetilcolina (ACh) e diminuiu a actividade



da AChE; contudo a actividade da ChAT apresentava-se aumentada (Rodríguez et al., 2003; Tyler e Allan, 2014).

O ácido glutâmico (GAD) é um marcador da actividade do sistema GABAérgico, tendo-se também observado alterações do mesmo em ratos expostos ao As (Rodríguez et al., 2003).

Estudos em animais mostraram que os efeitos neurológicos após a exposição a As envolviam alterações ao nível de neurotransmissores como a DA a norepineferina (NE) e serotonina (Jomova et al., 2011). A similaridade do As <sup>5+</sup> ao fosfato permite-lhe inibir reacções dependentes deste composto como é o caso da conversão da 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) em DA e 5-hidroxitriptofano em serotonina. Os estudos realizados no sistema monoaminérgico têm revelado resultados equívocos com resultados diferentes conforme os protocolos experimentais (Rodríguez et al., 2003; Tyler e Allan, 2014).

O papel do stress oxidativo no desenvolvimento de mecanismos de neurotoxicidade tem sido suportado por estudos *in vitro* e *in vivo*, podendo este ser um dos mecanismos iniciais da neurotoxicidade. O As <sup>3+</sup> inibe a GR e diminui os níveis intracelulares de GSH, importante para o balanço redox adequado e para protecção contra os danos oxidativos induzidos pelas ROS. As células do cérebro podem estar em particular risco de stress oxidativo, pois este obtém a sua energia quase exclusivamente através do metabolismo oxidativo, e possui poucos mecanismos de protecção se comparado com outros tecidos. Foi proposto que a produção de ROS devido ao As poderá produzir danos ao nível da membrana das mitocôndrias, activando a sua permeabilidade e promovendo a morte celular, sendo este dos mecanismos centrais propostos para explicar os danos neuronais (Flora, 2011; Rodríguez et al., 2003).

Outro mecanismo de neurotoxicidade proposto relaciona-se com as alterações provocadas pelo As nos citoesqueletos, à semelhança de outras doenças neurodegenerativas (Flora, 2011; Jomova et al., 2011; Vahidnia et al., 2007). A capacidade em modular a cinética de elementos essenciais no cérebro é também um mecanismo proposto (Flora, 2011).

---

### 1.6.5 Estudos Ocupacionais

---

Relativamente a estudos de exposição ocupacional ao As, podemos mencionar um estudo que foi realizado com o objectivo de identificar os eventuais efeitos no sistema nervoso, resultantes da exposição ao As a níveis dentro dos valores limite propostos para a exposição ocupacional. Utilizando uma população de 21 trabalhadores de vários postos de trabalho pertencentes a uma indústria de fundição de Cu, verificou-se que entre os sintomas manifestados a parestesia se correlacionava com a duração da exposição a As. Foram também encontradas algumas alterações ao nível das fibras nervosas nos parâmetros avaliados e feitas correlações das mesmas com as concentrações de As no ar do local de trabalho. A condução de impulsos nervosos ao nível do sistema óptico foi também avaliada. Concluiu-se que, para os valores de exposição apresentados, estes não revelavam induzir lesões no sistema nervoso que fossem indicativas de encefalopatia e polineuropatia tóxicas (Sińczuk-Walczak et al., 2010). Também em estudos anteriores relativos a exposição ocupacional a As (estudo realizado em 1982), foram reveladas alterações nas fibras nervosas detectadas em indivíduos ocupacionalmente expostos. Neste estudo, realizado em trabalhadores da indústria de fundição (47 indivíduos) com historial de exposição a poeiras contendo As durante vários anos, foram observados valores médios mais baixos na velocidade de condução nervosa em dois ou mais nervos periféricos analisados, quando comparados com o grupo controlo, sendo estes resultados interpretados como uma manifestação subclínica de neuropatia (Blom et al., 1985).



## 1.7 Interações de Misturas de Metais

A absorção, distribuição, metabolismo e excreção do Mn, Pb e As é conhecida, mas fundamentalmente para exposições a cada um destes metais individualmente. Apesar do reconhecimento geral de que cada componente de uma mistura pode afectar a toxicocinética e consequentemente os efeitos dos outros componentes, existe uma escassez de informação relacionada com a interacção *in vivo* destes metais, e ainda menos informação do comportamento dos mesmos em simultâneo na exposição humana (Andrade et al., 2014a). Assim, é de grande relevância compreender as interações entre os mesmos e as consequências destas alterações ao nível da toxicologia e das possíveis consequências a nível da saúde humana. Existem poucos estudos em animais que explorem as interações entre os três metais mencionados neste trabalho, e ainda um menor número de estudos realizados em Humanos. Nos parágrafos seguintes serão apresentados alguns estudos realizados sobre exposições a misturas de metais.

Foi elaborado um estudo em ratos expostos individualmente a Mn e Pb e conjuntamente a ambos os metais, com exposição a diferentes concentrações e durante 14 dias. Os principais resultados obtidos revelaram que as alterações comportamentais observadas nos animais e a acumulação de Pb no cérebro dos mesmos era significativamente maior quando se realizava a exposição a ambos os metais em simultâneo, comparativamente às exposições individuais. Alterações nos parâmetros neuroquímicos foram também detectadas, sendo igualmente mais graves nas exposições conjuntas (ATSDR, 2004a; Chandra et al., 1981). Noutro estudo efectuado em ratos com exposição a ambos os metais durante 30 dias, a fim de estudar o efeito da exposição simultânea na sua distribuição nos tecidos, resultou um aumento da acumulação de Pb em várias regiões do cérebro, comparativamente a exposição única a este metal. Em presença do Pb, aumentou significativamente as concentrações de Mn em apenas duas das sete regiões do cérebro analisadas, comparativamente a exposições únicas a Mn com a mesma concentração (ATSDR, 2004a; Shukla e Chandra, 1987). As razões pela qual o Mn aparenta aumentar as concentrações de Pb no cérebro ainda não são conhecidas, mas num estudo realizado em 1984, os investigadores concluíram que a administração conjunta de Mn e Pb altera a afinidade das proteínas de ligação no cérebro o que poderá explicar as variações nos padrões de distribuição do Pb (ATSDR, 2004a; Kalia et al., 1984).

Outros estudos foram também realizados com misturas de outros metais, tais como a combinação entre o Pb e As. Assim, num estudo realizado em ratos, a co-administração desta mistura resultou no aumento das concentrações de Pb no cérebro, conjuntamente com a diminuição das concentrações de As. As concentrações de neurotransmissores e seus metabolitos foram também analisadas, registando-se algumas alterações (ATSDR, 2004b; Mejía et al., 1997). Relativamente a estudos em humanos, neste caso realizado em crianças no México, os autores sugerem que a exposição a estes dois metais tem influência nas funções do SNC, podendo as capacidades verbais, a memória a longo prazo e os processos de atenção ser afectados nas crianças (Calderón et al., 2001).

A existência de alguns estudos relativos a exposição a Mn e As, sugerem a acumulação destes metais nos cérebros de ratos analisados, e um possível aumento da concentração de Mn no mesmo. Os autores associam também os efeitos desta exposição, ao efeito aditivo da presença de vários elementos e não só à de um único metal (Rodríguez et al., 1998). Num outro estudo em humanos, a observação de elevadas concentrações de Mn e As em amostras de cabelo, foi associada a um decréscimo dos resultados na avaliação da inteligência geral das crianças em estudo (Wright et al., 2006).

No que diz respeito a exposição a Mn, Pb e As, os três metais em análise neste trabalho, um estudo realizado com base na hipótese de que os níveis de Pb nos tecidos poderiam ser modificados quando

expostos simultaneamente a Mn e As, foi realizado em ratos. Assim os animais foram tratados individualmente com cada um destes metais e com a mistura dos mesmos, a fim de se determinar as diferenças nas concentrações de Pb em vários órgãos e tecidos. Nos resultados obtidos verificou-se que as concentrações de Pb no rim, cérebro e fígado, no grupo tratado com a mistura de metais, estavam significativamente aumentadas, quando comparadas com os restantes grupos. O Pb na urina dos ratos tratados com a mistura de metais, estava também aumentado, comparativamente ao grupo apenas tratado com Pb; contudo as concentrações de Pb-S apresentavam-se semelhantes nos dois grupos. De acordo com os resultados do estudo, os autores concluíram que o tratamento conjunto com Mn, Pb e As alteram a distribuição de Pb, especialmente no rim e cérebro, comparativamente a exposição única a este metal, e que a urina é capaz de reflectir este aumento, o que não acontece com as concentrações de Pb-S (Andrade et al., 2014a).

## 1.8 Biomarcadores

A determinação da exposição a uma determinada substância, da resposta de um organismo e a potencial susceptibilidade do mesmo aos efeitos tóxicos de agentes químicos, são parâmetros cruciais em toxicologia. Os biomarcadores são ferramentas que facilitam a avaliação destes parâmetros (Timbrell, 2002).

Os biomarcadores são definidos como indicadores de ocorrências em sistemas biológicos e podem ser classificados em três categorias: biomarcadores de exposição, efeito e susceptibilidade, como pode ser observado na figura abaixo

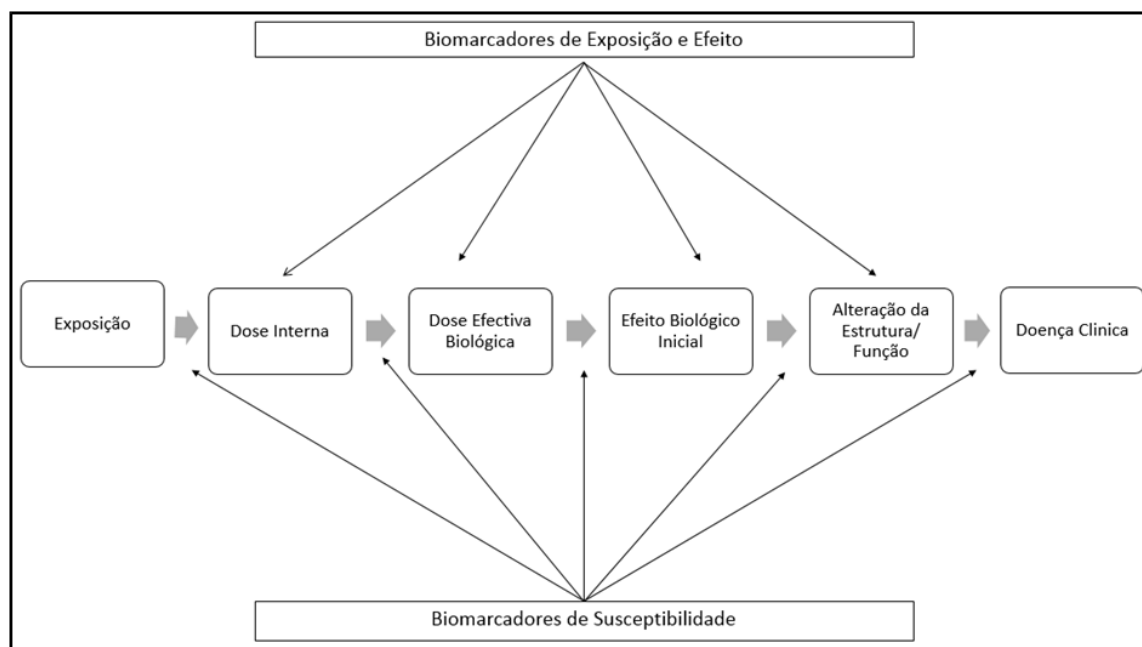


Figura 1.1 – Biomarcadores de efeito, exposição e susceptibilidade. Diagrama esquemático dos biomarcadores biológicos, indicando uma resposta progressiva do organismo a uma exposição a um determinado agente e os factores de susceptibilidade que podem afectar as etapas da progressão (Imagem adaptada de EPA, 2004).

Os biomarcadores de exposição podem incluir a quantificação do agente exógeno ou o complexo de substâncias endógenas e agentes exógenos dentro do sistema biológico/organismo. Os biomarcadores de efeito podem ser indicadores de um componente endógeno de um sistema biológico alterado,

reconhecido como uma alteração ou doença. Por fim, um biomarcador de susceptibilidade é um indicador de um sistema biológico especialmente vulnerável à acção tóxica de um agente exógeno. Estes marcadores podem ser determinados em tecidos e fluidos biológicos, por métodos invasivos e não invasivos, sendo os últimos preferíveis dada a sua maior aceitabilidade (Kakkar e Jaffery, 2005; Slikker e Bowyer, 2005; Timbrell, 2002). Os biomarcadores são, assim, ferramentas importantes para avaliar a exposição e a eventual toxicidade produzida por metais, em pessoas expostas através do ambiente, ou em ambientes específicos como é o local de trabalho. Os biomarcadores de exposição, como as concentrações de metais na urina e sangue, há muito que são utilizados nos mais diversos estudos, incluindo os ocupacionais. A urina, o sangue e o cabelo são os tecidos mais acessíveis para avaliar a exposição a metais (Casarett e Doull's, 2013).

---

### 1.8.1 Biomarcadores de Exposição

---

Nos parágrafos seguintes serão abordados de uma forma mais pormenorizada alguns biomarcadores de exposição como a determinação de Mn, Pb e As em fluidos biológicos, principalmente no sangue e urina, visto serem estes os fluidos biológicos escolhidos para este trabalho.

- **Determinação do Manganês em Amostras Biológicas**

Vários estudos sugerem que a concentração de Mn no sangue (Mn-S) pode ser utilizada na avaliação da exposição recente ao mesmo, contudo o mesmo não acontece quando a exposição ocorre por longos períodos de tempo, exposição crónica. Este biomarcador permite, no entanto, fazer a distinção entre populações expostas e as populações controlo. É necessário considerar a variação existente entre indivíduos, quer devido a dieta, quer devido a exposição ambiental. Uma outra razão de variabilidade prende-se com a discrepância que parece existir entre o tempo médio de vida do elemento no sangue e o seu tempo médio de vida em alguns tecidos (Aschner et al., 2007; Zheng et al., 2010).

A utilização do Mn na urina (Mn-U), apresenta-se como um biomarcador de utilização não invasiva; contudo, como a principal via de excreção deste elemento se faz através das fezes, este método sendo útil, não se apresenta como sendo o mais representativo (Aschner et al., 2007; Zheng et al., 2010). Os níveis deste metal nas fezes, saliva e cabelo têm sido também estudados a fim de se avaliar o seu potencial como biomarcador de exposição (ATSDR, 2012; Zheng et al., 2010).

- **Determinação do Chumbo em Amostras Biológicas**

Um dos parâmetros mais utilizado e considerado como um dos mais fiáveis na monitorização da exposição a Pb é a plumbémia, isto é, os níveis de Pb-S. Este biomarcador é representativo da presença de Pb nos tecidos moles apresentando, no entanto, algumas limitações, como o facto de não representar eficazmente diferenças nos níveis de concentrações de Pb, em exposição a elevadas doses e não ser eficaz na representação de exposições crónicas, devido ao facto do tempo de semi-vida do Pb-S ser curto. Os valores de Pb-S podem ser alterados pela libertação de Pb armazenado nos ossos em exposições anteriores, devendo esse aspecto ser considerado. A utilização da determinação de Pb no plasma como biomarcador (Pb-P) é extremamente difícil devido às baixas concentrações deste elemento nesta fracção do sangue (ATSDR, 2007a; Sanders et al., 2009).

A determinação do Pb na urina, denominada plumbúria (Pb-U), é uma técnica não invasiva, e uma boa opção para monitorizações realizadas por longos períodos de tempo, especialmente em ambientes ocupacionais, reflectido exposições recentes. A Pb-U representa a porção plasmática eliminada por filtração glomerular e apresenta-se como alternativa ao Pb-S. As principais limitações são a variação

diária da excreção urinária do elemento em causa e a influência de possíveis insuficiências renais (ATSDR, 2007a; Sanders et al., 2009).

Outro marcador de possível utilização é a concentração de Pb no tecido ósseo e dentário. O Pb nos ossos e dentes pode ser utilizado para estudar exposições antigas e por isso ser usado como indicador de exposição crónica, mas unicamente em situações pontuais devido ao carácter invasivo da análise e maior dificuldade no tratamento da amostra. Existe ainda a possibilidade de utilização de cabelo e unhas, mas em ambos os casos as amostras podem estar sujeitas a contaminações externas, não sendo estas muito utilizadas (ATSDR, 2007a; Sanders et al., 2009).

- **Determinação do Arsénio em Amostras Biológicas**

A determinação das concentrações de As e seus metabolitos no sangue, urina, cabelo e unhas tem sido utilizada como indicador biológico de exposição a este metalóide (ATSDR, 2007b; Jarup, 2003; Jomova et al., 2011).

A maioria do As absorvido através dos pulmões e pelo tracto gastrointestinal é excretado na urina, predominantemente nos 2 primeiros dias após a exposição. Assim, a sua determinação na urina (As-U) é geralmente aceite como um indicador confiável para exposições recentes (ATSDR, 2007b; Jomova et al., 2011). Uma vez que o As no sangue (As-S) é removido do mesmo em algumas horas, as determinações do As neste fluido reflectem exposições recentes, não aparentando este indicador ser o melhor para avaliação da exposição crónica a este elemento (ATSDR, 2007b; Jomova et al., 2011).

A presença de As no cabelo e unhas pode ser um indicador útil de exposições menos recentes a este metal, se for tida em consideração a possível contaminação externa deste tipo de amostras (ATSDR, 2007b; Jarup, 2003).

---

## 1.8.2 Biomarcadores de Efeito

---

Nos tópicos que se seguem serão mencionados alguns biomarcadores de efeito resultantes da exposição ao Mn, Pb e As. Os biomarcadores escolhidos são resultado dos efeitos comuns da exposição aos metais em estudo.

- **Avaliação de Alterações na Síntese do Heme**

A síntese do heme, esquematizada na figura 1.2, tem um papel fundamental em todas as células nucleadas, podendo exemplificar com a importância do heme para a síntese da hemoglobina dos eritrócitos, e no fígado para a síntese de inúmeras hemoproteínas (Ng et al., 2005).

O Mn, o Pb e o As exercem vários efeitos no sistema hematopoético, incluindo a interferência na síntese do heme. Várias enzimas responsáveis pela síntese metabólica do heme são sensíveis aos efeitos do Pb e As devido à afinidade para o grupo sulfidrilo das enzimas. O As é conhecido por afectar um grande número de enzimas, entre elas enzimas responsáveis pela síntese e degradação do heme. Menos informação se encontra disponível relativamente à influência do Mn a nível da síntese do heme (Andrade et al., 2015; ATSDR, 2004b). A interferência na síntese do heme é geralmente caracterizada pela excessiva acumulação e excreção de ALA e porfirinas (Andrade et al., 2013; Andrade et al., 2014b; Andrade et al., 2015).

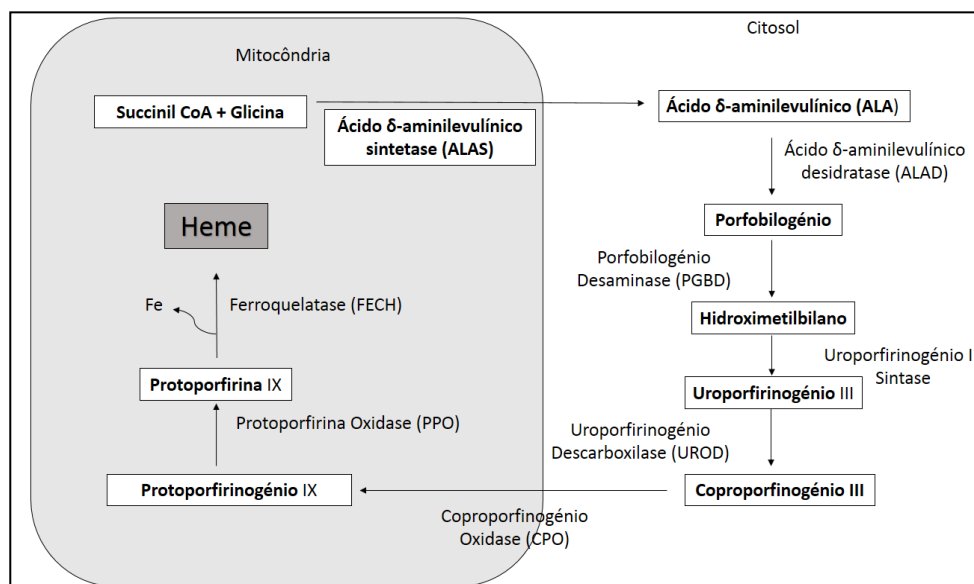


Figura 1.2 - Biossíntese do heme. Esquema da síntese do grupo heme, representando as suas diferentes etapas e respectivos intervenientes (Imagem adaptada de Ajioka et al., 2006).

A ALAD é a segunda enzima na biossíntese do heme e catalisa a condensação de duas moléculas de ALA para formar uma molécula de porfobilinogénio. O ALA é sintetizado nas mitocôndrias a partir da glicina e da succinil CoA pela ALA-sintetase (ALAS), como pode ser observado na figura 1.2. Através de um mecanismo de feedback-negativo, a diminuição da síntese do heme, leva a um aumento da ALAS e consequente aumento na produção de ALA. A diminuição da actividade da ALAD, inibindo a sua transformação e a activação indirecta da ALAS leva ao aumento do ALA e consequente aumento de excreção deste na urina. A biossíntese do heme não diminui até a actividade da ALAD estar inibida em 80-90% (Ademuyiwa et al., 2005; Andrade et al., 2013; Flora et al., 2012; Sakai, 2000).

O ALA tem a capacidade de exercer inúmeros efeitos, como por exemplo a formação de radicais e posteriores danos oxidativos, alterações na captação e libertação do GABA e glutamato. Tem vindo a ser proposto que a acumulação de ALA pode estar relacionada com determinadas manifestações neuropsiquiátricas. Apesar do ALA também ser produzido no cérebro, o seu transporte até este permanece desconhecido; foi sugerido que a difusão passiva através da BHE poderá ser um dos mecanismos, existindo também a possibilidade de um transporte activo específico. Mecanismos de regulação com o objectivo de evitar a acumulação de ALA no cérebro, foram também sugeridos (Adhikari et al., 2006; Andrade et al., 2013).

Para além do ALA, outros componentes da síntese do heme, como é o caso das porfirinas, vão sofrer acumulação quando esta síntese é alterada. Devido a disrupção deste processo metabólico, os precursores de porfirinas acumulados, vão ser excretados na urina. Os coproporfirinogénio I e III, por exemplo, são metabolitos intermediários e são facilmente oxidados nas suas respectivas coproporfirinas, verificando-se o aumento de coproporfirina III, na excreção urinária (Andrade et al., 2014b; Sakai, 2000). A excessiva acumulação de porfirinas é considerada responsável por algumas patologias associadas ao sistema nervoso (Simon e Herkes, 2011).

Relativamente aos metais em estudo, e no caso do Mn, há um estudo que revela a capacidade deste elemento inibir a actividade da ALAS no cérebro de ratos (Maines, 1980).

Um estudo realizado com o objectivo de avaliar a extensão da inibição de ALAD em populações ocupacionalmente expostas ao Pb, foi realizado em grupos de artesãos na Nigéria. Foram igualmente determinadas as concentrações de protoporfirinas nos eritrócitos e correlacionados ambos os parâmetros com as concentrações de Pb-S. Verificou-se a existência de uma diminuição estatisticamente significativa de ALAD e um aumento das protoporfirinas nos eritrócitos, que se correlacionavam com a plumbémia (Ademuyiwa et al., 2005). Num outro estudo, também realizado em trabalhadores expostos a baixos níveis de Pb no Japão, observou-se que os valores de ALA-U diminuíram quando os valores de Pb-S aumentavam até um limite abaixo de 20 µg/dl, contudo com o aumento de Pb-S acima de 22,4 µg/dl verificou-se o aumento dos valores de ALA-U, aumentando mais marcadamente acima dos 35.5 µg/dl de Pb-S (Makino et al., 2000).

O Pb tem também a capacidade de inibir o último passo da biossíntese do heme [a incorporação do ião Fe na protoporfirina XI, catalisado pela ferroquelatase] levando a sua acumulação no sangue na forma livre ou complexada com Zn, nos eritrócitos (Ademuyiwa et al., 2005; Flora et al., 2012; Papanikolaou et al., 2005; Sakai, 2000).

No que diz respeito ao As, foi realizado um estudo com o objectivo de avaliar as alterações no metabolismo das porfirinas em indivíduos de vários grupos etários, expostos à queima de carvão na China, para se estudar o seu potencial uso como biomarcador da exposição crónica a As. Como principais resultados verificou-se o aumento de porfirinas nas populações expostas a As. O aumento de porfirinas na urina comparadas com os respectivos controlos, estava relacionado com o aumento dos níveis de As-U. Os aumentos mais significativos de porfirinas foram observados nos grupos de pessoas mais jovens e idosas, e em especial no grupo feminino (Ng et al., 2005). Num outro estudo realizado no México em indivíduos expostos através da ingestão de água contaminada com As, foi também observado um aumento da excreção urinária das porfirinas totais (Hernández-Zavala et al., 1999).

Considerando que os três metais possuem a capacidade de interferir na síntese do heme, foram efectuados alguns estudos partindo do pressuposto de que na maior parte das situações, a exposição aos metais em estudo não ocorre isoladamente, mas na forma de misturas complexas.

A exposição a estes 3 metais pode originar um aumento de ALA e partindo do pressuposto que este pode potenciar a neurotoxicidade induzida por estes três metais, foi realizada uma investigação em ratos expostos à mistura destes três metais para estudar a possível utilização dos níveis de ALA urinário como biomarcador de exposição e/ou de efeitos neurotóxicos. Os níveis de ALA urinários observados foram superiores nos ratos tratados com a mistura de metais comparativamente aos ratos expostos individualmente a cada metal, existindo ainda uma correlação entre os valores de ALA urinários e os níveis deste composto no cérebro. Os resultados obtidos mostraram ainda uma correlação positiva entre os níveis de ALA no cérebro de ratos expostos à mistura e um decréscimo da actividade motora nos animais. Estes resultados apontaram para um aumento da neurotoxicidade quando existe exposição a misturas de metais tendo sido sugerido que o ALA pode ser proposto como biomarcador sensível de efeitos neurotóxicos originados por esta mistura (Andrade et al., 2013). Pelos mesmos autores, foi realizado um novo estudo, desta vez a fim de investigar a capacidade de combinação da análise das porfirinas urinárias em prever a magnitude do decréscimo na actividade motora, induzida pela exposição de ratos à mesma mistura de metais, tendo os perfis de porfirinas sido previamente analisados nas referidas amostras. Após tratamento dos resultados concluiu-se que os níveis de porfirinas tanto no cérebro como na urina conseguem prever de forma razoável a magnitude das alterações motoras em ratos expostos à mistura destes metais, As, Pb e Mn (Andrade et al., 2014b).

#### ▪ Avaliação de Alterações no Sistema Colinérgico

A ACh é um mediador químico sináptico do SNC, SNP e da junção neuromuscular. A ACh, os seus receptores e os constituintes enzimáticos responsáveis pela sua síntese e degradação constituem o sistema de neurotransmissão colinérgica. A ChAT é a enzima responsável pela síntese da ACh a partir da acetil-coenzima A e da colina. Uma vez sintetizada, parte da ACh é transportada e armazenada em vesículas sinápticas. Após ser libertada por exocitose, a ACh interage especificamente com os receptores colinérgicos presentes nas membranas pré- e pós- sinápticas, e sua acção cessa quando é hidrolisada pela enzima AChE presente na fenda sináptica (Ventura et al., 2010).

A actividade normal da AChE no cérebro é essencial para o bom funcionamento do mesmo e alterações na sua actividade são referidas como sendo acompanhadas por sinais claros de toxicidade (Babadi et al., 2014). Assim, e apesar de menos estudado do que o sistema dopaminérgico, as funções colinérgicas são também alteradas após exposição aos três metais em estudo (Andrade et al., 2015). Várias doenças relacionadas com o deficiente funcionamento do sistema colinérgico têm vindo a ser estudadas, podendo mencionar a doença de Alzheimer, a epilepsia e a esquizofrenia (Ventura et al., 2010).

No que diz respeito ao Mn, a informação sobre as possíveis alterações no sistema colinérgico após a exposição a este elemento são consideravelmente menores do que a sua associação a outros sistemas de neurotransmissores, havendo, no entanto, estudos que indicam efeitos deste metal no sistema colinérgico (Finkelstein et al., 2007). Foi realizado um estudo em ratos expostos ao Mn, com o objectivo de testar a hipótese de a diminuição da actividade da AChE poder estar relacionada com a neurotoxicidade originada pelo mesmo. Verificou-se neste estudo que a actividade do AChE se apresentava reduzida e que os grupos expostos exibiam sinais de alterações neuro-comportamentais, para além de estarem aumentados os biomarcadores de stress oxidativo e de neuro-inflamação; pôde assim ser observado, e de acordo com as condições de exposição ao Mn na referida experiência, uma alteração na actividade da AChE que foi acompanhada de stress oxidativo no cérebro e de efeitos neurotóxicos (Santos et al., 2012). Um outro estudo também realizado em ratos, focou-se nos efeitos da actividade da AChE no cérebro, após administração intranasal, quer aguda quer crónica, de Mn. Observados os resultados, verificou-se que nas exposições agudas a actividade da AChE estava aumentada, sendo o aumento mais visível na presença das concentrações mais elevadas (15 mg/Kg comparativamente a 10 mg/Kg). Nas exposições crónicas foi registado também um aumento, sendo o mesmo maior quanto maior fosse o tempo de exposição (Babadi et al., 2014).

Num estudo de exposição ocupacional ao Pb foi avaliada a actividade da AChE nos eritrócitos, como indicador dos efeitos neurotóxicos, numa população de artesãos na Nigéria. Foi também avaliada a pressão sanguínea e a pulsação, visto ambos os parâmetros serem controlados ao nível do sistema nervoso simpático pela neurotransmissão colinérgica. Os resultados demonstraram que a actividade da AChE se apresentava diminuída na população em estudo e que a mesma estava negativamente correlacionada com as concentrações de Pb-S, verificando-se assim um possível efeito inibitório desta enzima originado pelo Pb (Ademuyiwa et al., 2007).

No que diz respeito ao As, foi realizado um estudo no Bangladesh, em indivíduos expostos cronicamente através da ingestão de água contaminada, a fim de analisar a relação entre a actividade da colinesterase no plasma e a exposição ao As. Verificou-se um decréscimo na actividade desta enzima com o aumento das concentrações do As na água, e consequentemente nas unhas e cabelos das pessoas expostas, observando-se uma correlação negativa. As diferenças entre os níveis de actividade da colinesterase e as diferentes concentrações de As também se mostraram significativas (Ali et al., 2010).

## **2º CAPÍTULO - OBJECTIVOS**

Este trabalho teve como objectivos:

- 1- Estudar a exposição ocupacional de uma população mineira, a uma mistura de metais, concretamente ao Mn Pb e As;
- 2- Avaliar alterações bioquímicas induzidas pela exposição a metais ao nível de alguns parâmetros bioquímicos como a acetilcolinesterase e metabolitos da biossíntese do heme;
- 3- Correlacionar as alterações encontradas com a exposição aos referidos metais.

Para atingir estes objectivos foram realizadas as seguintes determinações:

- A. Doseamento do Mn, Pb e As em amostras de sangue e urina de trabalhadores expostos a metais numa mina;
- B. Doseamento de Mn, Pb e As em amostras de sangue e urina em populações não expostas ocupacionalmente a metais (dois grupos controlo);
- C. Determinação da AChE no sangue como biomarcador de efeito neurotóxico;
- D. Determinação das porfirinas e do ALA na urina como marcadores de alterações na síntese de heme e de efeito neurotóxico;
- E. Comparação de todos os parâmetros do grupo exposto ocupacionalmente com os dos grupos controlo;
- F. Correlação entre os biomarcadores de exposição e os de efeito;



### **3º CAPÍTULO - METODOLOGIA EXPERIMENTAL**

#### **3.1 Reagentes**

Os principais reagentes utilizados foram: ethyl acetoacetate ( $C_6H_{10}O_3$ )  $\geq 98\%$  Merck; manganese standard for AAS, Fluka Analytical 1000 mg/L  $\pm 4$  mg/L c ( $HNO_3$ ) = 2% W/W; ethanol absolut p.a. Merck ( $C_2H_5OH$ ), purity (GC)  $\geq 99\%$ ; ethyl acetate 99,9 % assay (GC) ( $C_4H_8O_2$ ), Fisher Chemical; triton X-1000, Sigma-Aldrich; nitric acid  $\geq 65\%$ , Sigma-Aldrich ( $HNO_3$ ); diethyl ether  $\geq 99,8\%$  ( $C_4H_{10}O$ ), Sigma-Aldrich; nitric acid trace metal grade ( $HNO_3$ ) 67-69% assay, Fisher Chemical; hydrochloric acid 36,5-38,0% ACS Basic (HCL), Scharlau; acetic acid glacial 99,7 % ( $CH_3COOH$ ), Panreac; hydrogen peroxide 100 vol  $> 30$  % W/V ( $H_2O_2$ ), Fisher Chemical; acetylthiocholine iodide ( $C_7H_{16}INOS$ ), Sigma  $\geq 98\%$ ; 5-aminolevulinic acid hydrochloride 98% ( $C_5H_9NO_3 \cdot HCL$ ), Sigma; ethopropazine hydrochloride  $\geq 98\%$  ( $C_{19}H_{24}N_2S \cdot HCL$ ), Sigma-Aldrich; MRC TM 24,3 (Environment Canada analytical reference material); 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)  $\geq 98\%$ , bioreagent, Sigma ( $C_{14}H_8N_2O_8S_2$ ).

#### **3.2 Caracterização da População/Amostras**

Foram analisadas amostras de sangue e urina de trabalhadores de uma indústria mineira expostos ocupacionalmente a vários metais, incluindo os metais em estudo, Mn, Pb e As, constituindo esta população o grupo (O) (43 trabalhadores). As amostras foram recolhidas pelo técnico de saúde do Departamento de Medicina no Trabalho da empresa mineira, e transportadas em mala térmica com gelo para o laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia (Universidade de Lisboa) logo após a colheita.

Como amostras controlo foram também utilizadas sangue e urina de populações não ocupacionalmente expostas. Estas foram recolhidas em duas zonas distintas com o objectivo de obter duas populações diferentes: uma população residente próximo de uma zona industrial (grupo Ci) e a outra residente numa zona menos industrial, a que chamámos zona rural (grupo Cr). O total de amostras foi organizado em dois conjuntos, A e B, sendo o primeiro (A) relativo a amostras de sangue e urina dos mesmos indivíduos e recolhidas na mesma altura, o segundo grupo (B) relativo a amostras de sangue e urina, mas não havendo uma correspondência entre as amostras para os mesmos indivíduos.

Todas as amostras de sangue foram recolhidas por um técnico de saúde na veia cubital para tubos com anticoagulante; as amostras de urina foram recolhidas de manhã (à 5ª feira no caso do grupo exposto ocupacionalmente) e correspondem à urina de uma micção.

Após a chegada das amostras ao laboratório (no próprio dia da colheita) estas foram codificadas e colocadas numa base de dados e armazenadas de imediato a  $-20^\circ C$ . As análises foram realizadas com a brevidade possível (nas duas semanas seguintes), tendo havido prioridade na análise dos parâmetros da AChE e porfirinas, dada a sua mais rápida alteração.

### 3.3 Métodos

---

#### 3.3.1 Determinação de Metais no Sangue e Urina

---

Os métodos de espectrofotometria de absorção atômica são utilizados para a determinação quantitativa e qualitativa de mais de 70 elementos. Estes métodos são rápidos e possuem elevada selectividade. O passo comum em todos os processos de absorção atômica é a atomização, um processo em que a amostra é volatilizada e decomposta, de forma a produzir átomos que serão depois analisados. Neste trabalho, para a análise do Mn e do Pb foi utilizada a espectrofotometria de absorção atômica com câmara de grafite (GFAAS) e para a análise de As foi utilizado o gerador de hidretos (HGAAS); o aparelho utilizado foi o modelo PerkinElmer, AAnalyst-700 (Skoog et al., 2014).

A técnica de HGAAS fundamenta-se na formação de hidretos, após redução da amostra, seguindo-se a sua atomização e análise do elemento a determinar (Lajunen e Peräimäki, 2004).

##### I. Tratamento do material

De forma a evitar contaminações, todo o material utilizado para a determinação de metais foi descontaminado, tendo para isso sido colocado 24 horas em  $\text{HNO}_3$  ( $\geq 65\%$ ), numa solução de 15 % em água desionizada. Após esse tempo procedeu-se a lavagem do material novamente com esta solução e posteriormente 2 vezes com água destilada e 2 vezes com água desionizada. O material foi seco e guardado em local protegido até sua utilização.

##### II. Preparação das amostras

Todas as amostras analisadas foram previamente sujeitas a uma digestão ácida de forma a eliminar toda a matéria orgânica. Assim: a) para a digestão da amostra de sangue pesou-se 100 mg em vasos digestores (Park Microwave Acid Digestion Vessels) tendo sido adicionados 2,5 ml  $\text{HNO}_3$  (67-69%) e 400  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , procedendo-se 24 horas depois a 2 pulsos em microondas com 600 e 900 W durante 30 segundos cada. Após digestão das amostras estas foram transferidas para balões volumétricos onde se procedeu à sua diluição; b) para a digestão das amostras de urina utilizou-se 2,5 ml de amostra após centrifugação a 2000 rpm durante 3 minutos. A digestão ocorreu durante 2 horas e 30 minutos em banho a  $100^\circ\text{C}$  após adição de 750  $\mu\text{l}$  de  $\text{HNO}_3$  e 750  $\mu\text{l}$  de  $\text{HCl}$ . Após este período de tempo o conteúdo foi retirado e o seu volume ajustado em balões volumétricos.

##### III. Leitura das amostras no espectrofotómetro de absorção atômica

Para a análise de As realizaram-se os seguintes passos após a digestão das amostras, e antes da leitura no espectrofotómetro de absorção atômica: a) pipetar 1 ml de amostra b) adicionar 1 ml de ácido ascórbico, 1 ml de  $\text{HCl}$  concentrado e 1 ml de iodeto de potássio c) perfazer a solução com água desionizada num balão volumétrico e aguardar 45 minutos. A reacção de redução foi realizada utilizando  $\text{HCl}$  a 10% e  $\text{NaBH}_4$  a 0.2% em  $\text{NaOH}$  a 0.05%.

Foram realizadas curvas de calibração diárias em todas as leituras efectuadas. Assim foram analisados brancos de reagente para cada metal e respeitadas as matrizes das amostras. As concentrações utilizadas para as curvas de calibração foram as seguintes: Mn (5; 10; 15; 20  $\mu\text{g}$  de Mn/ L de água desionizada), Pb (4; 8; 20; 40; 80  $\mu\text{g}$  de Pb / L de água desionizada), As (1,25; 2,5; 5; 10; 20  $\mu\text{g}$  de As/L de água desionizada).

##### IV. Testes de validação determinados

Um método de ensaio é um processo que envolve manipulações susceptíveis de acumular erros, podendo assim, em algumas situações, alterar de forma significativa o valor do resultado final. É então fundamental que existam critérios objectivos que demonstrem que os métodos de ensaio utilizados conduzem a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida. Assim, na tabela 3.1, encontram-se os parâmetros de validação estimados para os métodos de determinação de metais na urina e sangue.

Tabela 3.1 – Parâmetros de validação estimados para os métodos de determinação de metais.

	Limite de Detecção	Limite de Quantificação	Coefficiente de Variação de Repetibilidade	Coefficiente de Determinação ( $r^2$ )
Mn-U	1,94 µg/L	5,89 µg/L	12,5 %	0,998
Pb-U	2,8 µg/L	8,5 µg/L	8 %	0,993
As-U	0,55 µg/L	1,69 µg/L		1,000
Mn-S	1,16 µg/L	3,50 µg/L	6,65 %	0,998
Pb-S	10,54 µg/L	31,94 µg/L	8,96 %	0,996
As-S	0,55 µg/L	1,69 µg/L		1,000

Utilizando-se Materiais de Referência Certificados com concentrações de Mn de  $8,12 \mu\text{g/L} \pm 0,72$  e Pb de  $5,82 \pm 0,45 \mu\text{g/L}$ , determinou-se também a exactidão de Mn e Pb, sendo estas  $10,64 \mu\text{g/L}$  e  $5,29 \mu\text{g/L}$ , para cada um dos metais respectivamente.

### 3.3.2 Determinação da Acetilcolinesterase no Sangue

Os métodos de medida baseados na utilização de radiação electromagnética são muito utilizados e baseiam-se na medição da quantidade de radiação produzida ou absorvida pelas espécies moleculares ou atómicas analisadas. Estes métodos são classificados de acordo com a região do espectro electromagnético em utilização, neste caso na região da luz visível (Skoog et al., 2014). Para a determinação da actividade da AChE nas amostras de sangue foram feitos homogenatos das mesmas; para o efeito: a) efectuou-se a pesagem de aproximadamente 50 mg de sangue (registando-se o peso exacto) e foi adicionado solução tampão fosfato (pH 7,4) e triton em quantidades devidamente ajustadas ao peso do sangue de cada amostra; considerou-se que para 50 mg de sangue são usados 900 µl de tampão e 100 µl de triton; b) a partir de cada homogenato foram elaborados triplicados retirando-se do mesmo 250 µl e adicionando 500 µl de tampão, 25 µl de solução DTNB [39,6 mg de de ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) ( $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$ ): 10 ml de tampão fosfato)] e 2,5 µl de etopropazina [ $(\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{S}) \cdot \text{HCl}$ ] para inibição da pseudo-colinesterase; c) após esperar 10 minutos colocou-se numa cuvette 200 µl da solução, 1000 µl de tampão e 12,5 µl de substrato da AChE, acetiltiocolina ( $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{INOS}$ ), agitando o conteúdo; d) de imediato procedeu-se a leitura no espectrofotómetro a 436 nm de 10 em 10 segundos durante 3 minutos contra um branco de reagente (750 µl de tampão, 25 µl de DTNB e 2,5 µl de  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{S} \cdot \text{HCl}$ ). O método utilizado para esta análise foi o de Ellman modificado, tendo-se determinado o coeficiente de variação de repetibilidade; o valor obtido para o referido parâmetro foi de 13,60%. O cálculo da actividade da AChE foi realizado utilizando a fórmula abaixo indicada (Expressão 3.1) (Ellman et al., 1961).

$$\text{AChE } (\mu\text{mol AChE/min/g}) = (\text{Média } \Delta \times 0,0015) / (0,0136 \times \text{Peso Corrigido(g)})$$

em que:  $\Delta = \text{abs } t_n - \text{abs } t_{n-1}$ ,  $t = \text{tempo}$ ;

$$\text{Peso Corrigido (g)} = (\text{tecido pesado (g)} \times 25) / 2000$$

Expressão 3.1 – Expressão do cálculo da actividade da AChE

---

### 3.3.3 Determinação do Ácido $\delta$ -aminolevulínico na Urina

---

Para a determinação dos níveis de ALA na urina, as amostras foram primeiramente descongeladas. Em seguida: a) procedeu-se à centrifugação de 750  $\mu$ l de urina a 2000 rpm durante 3 minutos, retirando-se no final 500  $\mu$ l do sobrenadante; b) adicionou-se 500  $\mu$ l de tampão acetato (pH 4,6) e 67  $\mu$ l de acetoacetato de etilo ( $C_6H_{10}O_3$ ), seguindo-se de agitação num vortex; c) colocou-se em banho a 100° C durante 10 minutos; d) após arrefecimento, adicionou-se 1500  $\mu$ l de acetato de etilo ( $C_4H_8O_2$ ), seguido de nova agitação em vortex e centrifugação (2000 rpm, 3 min); d). Por fim, transferiu-se 1 ml da fase orgânica para novos tubos e adicionou-se 1 ml de reagente de Ehrlich modificado, terminando com nova agitação no vortex; e) após 10 minutos foi feita a leitura no espectrofotómetro do complexo corado formado a 553 nm contra o branco de reagentes (Tomokuni e Ogata, 1972).

Sempre que esta técnica foi realizada foram elaborados 5 padrões tratados e analisados como as amostras. As concentrações utilizadas para a realização da curva de calibração foram de 1,25; 2,5; 5; 10; 15 mg de ALA/L preparados em água desionizada. Os parâmetros de validação determinados para este método foram o limite de detecção e quantificação, tendo-se obtido os valores de 0,016 mg/L e 0,047 mg/L respectivamente. O estudo da linearidade levou à obtenção de um coeficiente de determinação de 0,996.

---

### 3.3.4 Determinação das Porfirinas na Urina

---

Durante a realização deste método as amostras encontraram-se sempre protegidas da luz, visto este ser um factor de deterioração do analito que se pretendia quantificar. Assim: a). Retirou-se 1 ml de urina após centrifugação (2000 rpm, 3 min) da amostra e adicionou-se em seguida 100  $\mu$ l de ácido acético glacial ( $CH_3COOH$ ) e 2,5 ml de éter dietílico ( $C_4H_{10}O$ ); b). As amostras foram agitadas no vortex para se proceder a uma extracção das porfirinas e em seguida centrifugadas (2000 rpm, 3 min) para separação de fases; c). Desprezou-se a fase aquosa e adicionou-se à fase orgânica 2,5 ml de solução clorídrica de iodo, agitando no vortex para nova extracção; centrifugar novamente (2000 rpm, 3 min); d). Realizou-se nova separação de fases desta vez desprezando a fase orgânica e mantendo a aquosa. Esta última foi depois colocada em banho a 37 ° C, durante 5 minutos antes da leitura por espectrofotometria contra HCL a 5% em comprimentos de onda de 380, 430 e 401 nm (Soulsby e Smith, 1974). O cálculo das concentrações de porfirinas realizou-se utilizando a seguinte formula:

$$[2 \times A_{\max} - (A_{430} + A_{380})] \times 2,093 \times 1,064 \times 1000 = x \mu g/L$$

Expressão. 3.2 – Expressão do cálculo das concentrações de porfirinas

---

### 3.3.5 Determinação de Creatinina na Urina

---

Todas as determinações realizadas em amostras de urina foram corrigidas pelos valores de creatinina determinados utilizando um Kit de Creatinina, Randox Creatinine (Crea).

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ACGIH, 2012. TLVs and BEIs. Based on the Documentation of the Threshold Limit Values for Chemical Substances & Physical Agents and Biological Exposure Indices. ACGIH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists. ACGIH Signature Publications, Cincinnati, OH.
- Ademuyiwa, O., Ugbaja, R.N., Ojo, D.A., Owoigbe, A.O., Adekun, S.E, 2005. Reversal of aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) inhibition and reduction of erythrocyte protoporphyrin levels by Vitamin C in occupational lead exposure in Abeokuta, Nigeria. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20, 404-411. doi:10.1016/j.etap.2005.04.00.
- Ademuyiwa, O., Ugbaja, R.N., Rotimi, S.O., Abam, E., Okediran, B.S, Dosumu, O.A., Onunkwor, B.O., 2007. Erythrocyte acetylcholinesterase activity as a surrogate indicator of lead-induced neurotoxicity in occupational lead exposure in Abeokuta, Nigeria. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 24, 183-188. doi:10.1016/j.etap.2007.05.002.
- Adhikari, A., Penatti, C.A.A., Resende, R.R., Ulrich, H., Britto, L.R.G., Bechara, E.J.H., 2006. 5-Aminolevulinate and 4, 5-dioxovalerate ions decrease GABA<sub>A</sub> receptor density in neuronal cells, synaptosomes and rat brain. *Brain Research* 1093, 95-104. doi:10.1016/j.brainres.2006.03.103.
- Ajioka, R.S., Phillips, J.D., Kushner, J.P, 2006. Biosynthesis of heme in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1763, 723-736. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.05.005.
- Ali, N., Hoque, M.A., Haque, A., Salam, K.A., Karim, M.R., Rahman, A., Islam, K., Saud, Z.A., Khalek, M.A., Akhand, A.A., Hossain, M., Mandal, A., Karim, M.R., Miyataka, H., Himeno, S., Hossain, K., 2010. Association between arsenic exposure and plasma cholinesterase activity: a population based study in Bangladesh. *Environmental Health* 9:36, 1-9. doi:10.1186/1476-069X-9-36.
- Andrade, V., Mateus, M.L., Batoréu, M.C., Aschner, M., Marreilha dos Santos, A.P., 2013. Urinary delta-ALA: A potential biomarker of exposure and neurotoxic effect in rats co-treated with a mixture of lead, arsenic and manganese. *NeuroToxicology* 38, 33-41. doi:10.1016/j.neuro.2013.06.003.
- Andrade, V., Mateus, M.L., Batoréu, M.C., Aschner, M., Marreilha dos Santos, A.P., 2014b. Changes in rat urinary porphyrin profiles predict the magnitude of the neurotoxic effects induced by a mixture of lead, arsenic and manganese. *NeuroToxicology* 45, 168-177. doi:10.1016/j.neuro.2014.10.009.
- Andrade, V., Mateus, M.L., Santos, D., Aschner, M., Batoreu, M.C., Marreilha dos Santos, A.P., 2014a. Arsenic and Manganese Alter Lead Deposition in the Rat. *Biological Trace Element Research* 158, 384-391. doi:10.1007/s12011-014-9954-2.
- Andrade, V.M., Mateus, M.L., Batoréu, M.C., Aschner, M., Marreilha dos Santos, A.P., 2015. Lead, Arsenic, and Manganese Metal Mixture Exposures: Focus on Biomarkers of Effect. *Biological Trace Element Research* 166, 13-23. doi:10.1007/s12011-015-0267-x.
- Aschner, M., Guilarte, T.R., Schneider, J.S., Zheng, W., 2007. Manganese: Recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 221, 131-147. doi:10.1016/j.taap.2007.03.001.
- ATSDR, 2004a. Interaction Profile for: Lead, Manganese, Zinc, and Copper. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

- ATSDR, 2004b. Interaction Profile for: Arsenic, Cadmium, Chromium, and Lead. U.S. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- ATSDR, 2007a. Toxicological Profile for Lead. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- ATSDR, 2007b. Toxicological Profile for Arsenic. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- ATSDR, 2012. Toxicological Profile for Manganese. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Babadi, V.Y., Sadeghi, L., Shirani, K., Malekiran, A.A., Rezaei, M., 2014. The Toxic Effect of Manganese on the Acetylcholinesterase Activity in Rat Brains. *Journal of Toxicology* 1-4. doi:10.1155/2014/946372.
- Blom, S., Lagerkvist, B., Linderholm, H., 1985. Arsenic exposure to smelter workers. Clinical and neurophysiological studies. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 11, 265-269.
- Bowler, R.M., Gysens, S., Diamond, E., Nakagawa, S., Drezgic, M., Roels, H. a., 2006. Manganese exposure: Neuropsychological and neurological symptoms and effects in welders. *Neurotoxicology* 27, 315–326. doi:10.1016/j.neuro.2005.10.007.
- Bowler, R.M., Roels, H.A., Nakagawa, S., Drezgic, M., Diamond, E., Park, R., Koller, W., Bowler, R.P., Mergler, D., Bouchard, M., Smith, D., Gwiazda, R., Doty, R.L., 2007. Dose-effect relationships between manganese exposure and neurological, neuropsychological and pulmonary function in confined space bridge welders. *Occupational and Environmental Medicine* 64, 167-177. doi:10.1136/oem.2006.028761.
- Brochin, R., Leone, S., Phillips, D., Shepard, N., Zisa, D., Angerio, A., 2008. The Cellular Effect of Lead Poisoning and Its Clinical Picture. *Journal Of Health Sciences*.
- Caldeira, C., Mattos, R., Meyer, A., Moreira, J., 2000. Limites de aplicabilidade da determinação do ácido  $\Delta$ -aminolevulínico urinário como teste screening na avaliação da intoxicação profissional pelo chumbo. *Cad. Saúde Pública*. 16, 225-230.
- Calderón, J., Navarro, M.E., Jimenez-Capdeville, M.E., Santos-Diaz, M.A., Golden, A., Rodriguez-Leyva, I., Borja-Aburto, V., Díaz-Barriga, F., 2001. Exposure to Arsenic and Lead and Neuropsychological Development in Mexican Children. *Environmental Research* 85, 69-76. doi:10.1006/enrs.2000.410.
- Campara, P., D'Andrea, F., Micciolo, R., Savonitto, C., Tansella, M., Zimmermann-Tansella, C., 1984. Psychological performance of workers with blood-lead concentration below the current threshold limit value. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 53, 233-246.
- Casarett. Doull's., 2013. Toxicology The basic science of poisons. 8ª edição. McGraw-Hill Education, USA
- Chandra, S.V., Ali, M.M., Saxena, D.K., Murthy, R.C., 1981. Behavioral and Neurochemical Changes in Rats Simultaneously Exposed to Manganese and Lead. *Archives of Toxicology* 49, 49-56.
- Cowan, D.M., Fan, Q., Zou, Y., Shi, X., Chen, J., Aschner, M., Rosenthal, F.S., Zheng, W., 2009. Manganese exposure among smelting workers: blood manganese–iron ratio as a novel tool for manganese exposure assessment. *Biomarkers* 14, 3-16. doi:10.1080/13547500902730672.

DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft, 2016. List of MAK and BAT Values 2016: Permanent Senate Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area. Report 52. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

DGEG, 2012. Mineral Resources Of Portugal. Direcção Geral de Energia e Geologia.

DGEG, 2015. Informação Estatística nº17. Serviços de Estratégia e Fomento dos Recursos Geológicos. Direcção Geral de Energia e Geologia, Lisboa.

Direção-Geral do Emprego, 2006. Guia Prático. Directiva Sobre Agentes Químicos 98/24/CE. Comissão europeia. DG Emprego, Assuntos Sociais e Igualdade de Oportunidades. Serviço das Publicações Oficiais das Comunidades Europeias, Luxemburgo.

Donoghue, A.M., 2004. Occupational health hazards in mining: an overview. *Occupational Medicine* 54, 283-289. doi:10.1093/occmed/kqh072.

Dorman, D.C., Struve, M.F., Clewe III, H.J., Andersen, M.E., 2006. Application of pharmacokinetic data to the risk assessment of inhaled manganese. *NeuroToxicology* 27, 752-764. doi:10.1016/j.neuro.2006.03.003.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95.

EPA, United States Environmental Protection Agency, 2004. Application of Biomarkers to Environmental Health and Risk Assessment. Office of Research and Development. National Center for Environmental Research. Science to Achieve Results (STAR) Program. URL: [https://cfpub.epa.gov/ncer/abstracts/index.cfm/fuseaction/display.rfatext/rfa\\_id/376](https://cfpub.epa.gov/ncer/abstracts/index.cfm/fuseaction/display.rfatext/rfa_id/376) (acedido em 1-6-17).

Finkelstein, Y., Milatovic, D., Aschner, M., 2007. Modulation of cholinergic systems by manganese. *NeuroToxicology* 28, 1003-1014. doi:10.1016/j.neuro.2007.08.006.

Flora, G., Gupta, D., Tiwari, A., 2012. Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdisciplinary Toxicology* 5, 47-58. doi:10.2478/v10102-012-0009-2.

Flora, S.J.S., 2011. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radical Biology and Medicine* 51, 257-281. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.008.

Gerber, G.B., Léonard, A., Hantson, P., 2002. Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. *Critical Reviews in Oncology Hematology* 42, 25-34.

Gidlow, D.A., 2015. Lead toxicity. *Occupational Medicine* 65, 348-356. doi:10.1093/occmed/kqv018.

Graeme, K.A., Pollack, C.V., 1998a. Heavy Metal Toxicity, Part II: Lead and Metal Fume Fever. *The Journal of Emergency Medicine* 16, 171-177.

Graeme, K.A., Pollack, C.V., 1998b. Heavy Metal Toxicity, Part I: Arsenic and Mercury. *The Journal of Emergency Medicine* 16, 45-56.

Gurer, H., Ercal, N., 2000. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning?. *Free Radical Biology & Medicine* 29, 927-945

Hernández-Zavala, A., Del Razo, L.M., García-Vargas, G.G., Aguilar, C., Borja, V.H., Albores, A., Cebrián, M., 1999. Altered activity of heme biosynthesis pathway enzymes in individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Archives of Toxicology* 73, 90-95.

Hogstedt, C., Hane, M., Agrell, A., Bodin, L., 1983. Neuropsychological test results and symptoms among workers with well-defined long-term exposure to lead. *British Journal of Industrial Medicine* 40, 99-105.

Horning, K.J., Caito, W.S., Tipps, K.G., Bowman, A.B., Aschner, M., 2015. Manganese Is Essential for Neuronal Health. *Annual Review of Nutrition* 35, 71-108. doi:10.1146/annurev-nutr-071714-034419.

Hughes, M.F., 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters* 133, 1-16.

Hughes, M.F., Beck, B.D., Chen, Y., Lewis, A.S., Thomas, D.J., 2011. Arsenic Exposure and Toxicology: A Historical Perspective. *Toxicological Sciences* 123, 305-332. doi:10.1093/toxsci/kfr184.

IARC., 2012. Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts. IARC Monographs On The Evaluation Of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 100C. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France.

Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B.B., Beeregowda, K.N., 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip. Toxicol.* 7, 60-72. doi:10.2478/intox-2014-0009.

Jankovic, J., 2005. Searching for a relationship between manganese and welding and Parkinson's disease. *Neurology* 64, 2021-2028. doi:10.1212/01.wnl.0000166916.40902.63.

Jarup, L., 2003. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 68, 167-182. doi:10.1093/bmb/ldg032.

Jomova, K., Jenisova, Z., Feszterova, M., Baros, S., Liska, J., Hudecova, D., Rhodes, C.J., Valko, M., 2011. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *Journal of Applied Toxicology* 31, 95-107. doi:10.1002/jat.1649.

Kaji, H., Ohsaki, Y., Rokujo, C., Higashi, T., Fujino, A., Kamada, T., 1993. Determination of Blood and Urine Manganese (Mn) Concentrations and the Application of Static Sensography as the Indices of Mn-exposure among Mn-refinery Workers. *Journal of UOEH* 15, 287-296.

Kakkar, P., Jaffery, F.N., 2005. Biological markers for metal toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19, 335-349. doi:10.1016/j.etap.2004.09.003.

Kalia, K., Chandra, S.V., Viswanathan, P.N., 1984. Effect of <sup>54</sup>Mn and Lead Interaction on their Binding with Tissue Proteins: In Vitro Studies. *Industrial Health* 22, 207-218.

Laires, M.J., 2010. Bioquímica, 4ª edição. Edições FMH, Cruz Quebrada.

Lajunen, L.H.J., Perämäki, P., 2004. Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission, 2ª edição. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

Maines, M.D., 1980. Regional distribution of the enzymes of haem biosynthesis and the inhibition of 5-aminolaevulinic synthase by manganese in the rat brain. *Biochemical Journal* 190, 315-321.

Maizlish, N.A., Parra, G., Feo, O., 1995. Neurobehavioural evaluation of Venezuelan workers exposed to inorganic lead. *Occupational and Environmental Medicine* 52, 408-414.



- Makino, S., Tsuruta, H., Takata, T., 2000. Relationship Between Blood Lead Level and Urinary ALA Level in Workers Exposed to Very Low Levels of Lead. *Industrial Health* 38, 95-98.
- Mansouri, M.T., Cauli, O., 2009. Motor alterations induced by chronic lead exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 27, 307-313. doi:10.1016/j.etap.2009.01.003.
- Marchetti, C., 2003. Molecular Targets of Lead in Brain Neurotoxicity. *Neurotoxicity Research* 5, 221-235. doi:10.1007/bf03033142
- Mason, L.H., Harp, J.P., Han, D.Y., 2014. Pb Neurotoxicity: Neuropsychological Effects of Lead Toxicity. *BioMed Research International* 2014, 1-8. doi:10.1155/2014/840547.
- Matos, M., Pinto Ramos, F., 2010. Indústria Extractiva: Análise de Riscos Ocupacionais e Doenças Profissionais, in: *Segurança E Higiene Ocupacionais – SHO*. Sociedade Portuguesa de Segurança e Higiene Ocupacionais (SPOSHO), 339-343.
- McPhee, B., 2004. Ergonomics in mining. *Occupational Medicine* 54, 297-303. doi:10.1093/occmed/kqh071.
- Mejía, J.J., Díaz-Barriga, F., Calderón, J., Ríos, C., Jiménez-Capdeville, M.E., 1997. Effects of Lead–Arsenic Combined Exposure on Central Monoaminergic Systems. *Neurotoxicology and Teratology* 19, 489-497.
- Michalke, B., Halbach, S., Nischwitz, V., 2007. Speciation and toxicological relevance of manganese in humans. *Journal of Environmental Monitoring* 9, 650-656. doi:10.1039/b704173j.
- Miguel, A.S., 2012. *Manual de Higiene e Segurança do Trabalho*, 12ª edição. Porto Editora, Porto.
- Moreira, A., 2010. Frequência dos polimorfismos genéticos ALAD (MspI) e VDR (BsmI), envolvidos na toxicocinética do Chumbo, numa população portuguesa. Dissertação de Mestrado em Contaminação e Toxicologia Ambientais. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto.
- Muameed, A.S., Saleh, A.M., 2014. Classification of Some Iraqi Soils Using Discriminant Analysis. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science* 7, 31-39.
- Nava-Ruiz, C., Méndez-Armenta, M., Ríos, C., 2012. Lead neurotoxicity: effects on brain nitric oxide synthase. *Journal of Molecular Histology* 43, 553-563. doi:10.1007/s10735-012-9414-2.
- Neal, A.P., Guilarte, T.R., 2013. Mechanisms of lead and manganese neurotoxicity. *Toxicology Research* 2, 99-114. doi:10.1039/c2tx20064c.
- Ng, J.C., Wang, J.P., Zheng, B., Zhai, C., Maddalena, R., Liu, F., Moore, M.R., 2005. Urinary porphyrins as biomarkers for arsenic exposure among susceptible populations in Guizhou province, China. *Toxicology and Applied Pharmacology* 206, 176-184. doi:10.1016/j.taap.2004.09.021.
- Nordic Council of Ministers, 2003. Lead Review. COWI Consulting Engineers and Planners.
- O’Neal, S.L, Zheng, W., 2015. Manganese Toxicity Upon Overexposure: a Decade in Review. *Current Environmental Health Reports* 2, 315-328. doi:10.1007/s40572-015-0056-x.
- Ogata, M., Taguchi, T., 1987. High performance liquid chromatographic procedure for quantitative determination of urinary delta-aminolevulinic acid as indices of lead exposure. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 59, 385-391.

- Olanow, C.W., 2004. Manganese-Induced Parkinsonism and Parkinson's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1012, 209-223. doi:10.1196/annals.1306.018.
- Papanikolaou, N.C., Hatzidaki, E.G., Belivanis, S., Tzanakakis, G.N., Tsatsakis, A.M., 2005. Lead toxicity update. A brief review. *Medical Science Monitor* 11, 329-336.
- Ratnaike, R.N., 2003. Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgraduate Medical Journal* 79, 391-396.
- Rivera-Mancía, S., Ríos, C., Montes, S., 2011. Manganese accumulation in the CNS and associated pathologies. *BioMetals* 24, 811-825. doi:10.1007/s10534-011-9454-1.
- Rodríguez, V.M., Dufour, L., Carrizales, L., Díaz-Barriga, F., Jiménez-Capdeville, M.E., 1998. Effects of Oral Exposure to Mining Waste on in Vivo Dopamine Release from Rat Striatum. *Environmental Health Perspectives* 106, 487-491.
- Rodríguez, V.M., Jiménez-Capdeville, M.E., Giordano, M., 2003. The effects of arsenic exposure on the nervous system. *Toxicology Letters* 145, 1-18. doi:10.1016/s0378-4274(03)00262-5.
- Sakai, T., 2000. Biomarkers of Lead Exposure. *Industrial Health* 38, 127-142.
- Sanders, T., Liu, Y., Buchner, V., Tchounwou, P.B., 2009. Neurotoxic Effects and Biomarkers of Lead Exposure: A Review. *Reviews on Environmental Health* 24, 15-45.
- Santamaria, A.B., 2008. Manganese exposure, essentiality & toxicity. *Indian J. Med. Res.* 128, 484–500.
- Santos, D., Milatovic, D., Andrade, V., Batoreu, M.C., Aschner, M., Marreilha dos Santos, A.P., 2012. The inhibitory effect of manganese on acetylcholinesterase activity enhances oxidative stress and neuroinflammation in the rat brain. *Toxicology* 292, 90-98. doi:10.1016/j.tox.2011.11.017.
- Saoudi, A., Zeghnoun, A., Bidondo, M., Garnier, R., Cirimele, V., Persoons, R., Fréry, N., 2012. Urinary arsenic levels in the French adult population: The French National Nutrition and Health Study, 2006–2007. *Science of The Total Environment* 433, 206-215. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.06.053
- SCOEL, 2002. Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for lead and its inorganic compounds. Employment, Social Affairs and Inclusion. European Commission. SCOEL/SUM/83.
- Shukla, G.S., Chandra, S.V., 1987. Concurrent Exposure to Lead, Manganese, and Cadmium and Their Distribution to Various Brain Regions, Liver, Kidney, and Testis of Growing Rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 16, 303-310.
- Silva, A.P.D., 1999. Análise Discriminante com Seleção de Variáveis. 1ª Parte: Descrição. *Revista de Estatística*. 2º Quadrimestre de 1999, 2º Volume.
- Simon, N.G., Herkes, G.K., 2011. The neurologic manifestations of the acute porphyrias. *Journal of Clinical Neuroscience* 18, 1147-1153. doi:10.1016/j.jocn.2011.01.003.
- Sińczuk-Walczak, H., Szymczak, M., Hałatek, T., 2010. Effects of occupational exposure to arsenic on the nervous system: Clinical and neurophysiological studies. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 23, 347-35. doi:10.2478/v10001-010-0034-3
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R., 2014. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9ª edição. Brooks/Cole, Cengage Learning, Belmont, USA.

- Slikker, W., Bowyer, J.F., 2005. Biomarkers of adult and developmental neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 206, 255-260. doi:10.1016/j.taap.2004.09.022.
- Soulsby, J., Smith, R.L., 1974. A simplified method for the quantitative determination of urinary coproporphyrin in lead workers. *British Journal of Industrial Medicine* 31, 72-74.
- Sousa, J., 2010. Exposição a metais pesados no ambiente de trabalho: estabelecimento de bioindicadores de exposição a poluentes. Mestrado em Biologia Humana e Ambiente. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.
- Summers, M.J., Summers, J.J., White, T.F., Hannan, G.J., 2011. The effect of occupational exposure to manganese dust and fume on neuropsychological functioning in Australian smelter workers. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 33, 692–703. doi:10.1080/13803395.2011.553585.
- Takeda, A., 2003. Manganese action in brain function. *Brain Research Reviews* 41, 79-87.
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J., 2012. Heavy Metal Toxicity and the Environment. *Experientia Supplementum* 101,133-164. doi:10.1007/978-3-7643-8340-4\_6.
- Timbrell, J., 2002. Introduction to toxicology, 3<sup>a</sup> edição. Taylor & Francis, Londres.
- Tomokuni, K., Ogata, M., 1972. Simple Method for Determination of Urinary  $\delta$ -Aminolevulinic Acid as Index of Lead Exposure. *Clinical Chemistry* 18, 1534-1536.
- Tong, S., Schirnding, Y.E., Prapamoto, T., 2000. Theme Papers: Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. Special Theme – Environment and Health. *Bulletin of the World Health Organization* 78, 1068-1077.
- Torres, J., 2011. Exposição profissional ao Chumbo. Análise da indução de efeitos genotóxicos. Tese de Doutoramento em Saúde Pública na especialidade de Saúde Ambiental e Ocupacional. Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade Nova de Lisboa.
- Tyler, C.R., Allan, A.M., 2014. The Effects of Arsenic Exposure on Neurological and Cognitive Dysfunction in Human and Rodent Studies: A Review. *Current Environmental Health Reports* 132-147. doi:10.1007/s40572-014-0012-1.
- Vahidnia, A., van der Voet, GB., de Wolff, FA., 2007. Arsenic neurotoxicity — A review. *Human & Experimental Toxicology* 26, 823-832. doi:10.1177/0960327107084539.
- Vahter, M., 2002. Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology* 181-182, 211-217.
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T.D., 2005. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry* 12, 1161-1208.
- Ventura, A.L.M., Abreu, P.A., Freitas, R.C.C., Sathler, P.C., Loureiro, N., Castro, H.C., 2010. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. *Rev Psiq. Clin.* 37, 66-72.
- Voulvoulis, N., Skolout, J.W.F., Oates, C.J., Plant, J.A., 2013. From chemical risk assessment to environmental resources management: the challenge for mining. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 7815-7826. doi:10.1007/s11356-013-1785-8.
- Williamson, A.M., Teo, R.K.C., 1986. Neurobehavioural effects of occupational exposure to lead. *British Journal of Industrial Medicine* 43, 374-380.

Woods, J.S., Martin, M.D., Leroux, B.G., DeRouen, T.A., Bernardo, M.F., Luis, H.S., Leitão, J.G., Simmonds, P.L., Rue, T.C., 2009. Urinary porphyrin excretion in normal children and adolescents. *Clinica Chimica Acta* 405, 104-109. doi:10.1016/j.cca.2009.04.014.

Wright, R.O., Amarasinghwardena, C., Woolf, A.D., Jim, R., Bellinger, D.C., 2006. Neuropsychological correlates of hair arsenic, manganese, and cadmium levels in school-age children residing near a hazardous waste site. *NeuroToxicology* 27, 210-216. doi:10.1016/j.neuro.2005.10.001

Zheng, W., Aschner, M., Gherzi-Egea, J.F., 2003. Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research. *Toxicology and Applied Pharmacology* 192, 1-11. doi:10.1016/s0041-008x(03)00251-5.

Zheng, W., Fu, S.X., Dydak, U., Cowan, D.M., 2010. Biomarkers of manganese intoxication. *NeuroToxicology* 32, 1-8. doi:10.1016/j.neuro.2010.10.002.